

# ESTUDIO DE AGREGADOS SUPRAMOLECULARES MEDIANTE TÉCNICAS DE DESORCIÓN/IONIZACIÓN Y ESPECTROSCOPIA LÁSER

PAOLA MARÍA HURTADO CASTILLO

DIRECTOR: PROF. DR. BRUNO MARTÍNEZ HAYA



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS FÍSICOS, QUÍMICOS Y NATURALES



---

---

# Índice general

---

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Agradecimientos</b>   | <b>II</b> |
| <b>Prefacio</b>  | <b>VI</b> |
| <b>Resumen de conclusiones</b>                                     | <b>XI</b> |
| <b>I Agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI-TOF</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. Introducción</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1. Motivación y objetivos generales del bloque . . . . .         | 5         |
| 1.2. Desorción/ionización láser . . . . .                          | 5         |
| 1.3. Mecanismos de desorción e ionización láser . . . . .          | 8         |
| 1.3.1. El proceso de desorción . . . . .                           | 9         |
| Ablación y desorción láser . . . . .                               | 9         |
| La pluma de desorción . . . . .                                    | 11        |
| 1.3.2. Ionización en experimentos LDI/MALDI . . . . .              | 13        |
| Mecanismos de ionización primaria. . . . .                         | 14        |
| Mecanismos de ionización secundaria. . . . .                       | 14        |
| 1.4. Agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI . . . . . | 15        |
| Referencias . . . . .  | 19        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2. Metodología</b>  | <b>23</b> |
| 2.1. Espectrómetro de masas del equipo LDI/MALDI-TOF . . . . .                                       | 24        |
| 2.1.1. Calibración en masas . . . . .  | 29        |
| 2.1.2. Puesta a punto del sistema de extracción pulsada de iones . . . . .                           | 30        |
| Optimización de la resolución en masas . . . . .   | 32        |
| Efecto de la extracción pulsada sobre la dinámica de la pluma . . . . .                              | 33        |
| 2.2. Sistemas láser . . . . .  | 34        |
| 2.2.1. Láser de Nd:YAG . . . . .   | 34        |
| 2.2.2. Láser ultravioleta sintonizable . . . . .   | 35        |
| 2.2.3. Láser infrarrojo sintonizable OPO/OPA . . . . .   | 35        |
| 2.3. Métodos de preparación de muestras . . . . .  | 36        |
| 2.3.1. Matrices MALDI . . . . .  | 36        |
| 2.3.2. Método de coprecipitación ( <i>air dried-droplet</i> ) . . . . .                              | 37        |
| 2.3.3. Preparación de muestras libres de disolvente ( <i>solvent-free</i> ) . . . . .                | 38        |
| 2.3.4. Uso de líquidos iónicos como matrices MALDI . . . . .   | 40        |
| Síntesis de RTILs y preparación de muestras . . . . .  | 41        |
| Referencias . . . . .  | 45        |
| <b>3. Procesos fragmentativos y de agregación en fase gaseosa en análisis LDI/MALDI de triazinas</b> | <b>47</b> |
| 3.1. Introducción . . . . .  | 48        |
| 3.1.1. Objetivos . . . . .   | 48        |
| 3.1.2. Triazinas . . . . .   | 49        |
| 3.2. Discusión de resultados . . . . .   | 50        |
| 3.2.1. Aspectos técnicos y metodológicos . . . . .   | 50        |
| 3.2.2. Fragmentación en experimentos LDI de triazinas . . . . .                                      | 51        |



|  |           |
|--|-----------|
| Fragmentación de clorotriazinas . . . . .  | 51        |
| Fragmentación de mercaptotriazinas . . . . .   | 54        |
| 3.2.3. Agregación supramolecular en experimentos LDI de triazinas . . . . .  | 55        |
| Agregación de clorotriazinas . . . . .   | 55        |
| Agregación de mercaptotriazinas . . . . .  | 56        |
| 3.2.4. Experimentos MALDI de triazinas . . . . .   | 57        |
| 3.3. Conclusiones . . . . .  | 58        |
| Referencias . . . . .  | 61        |
| <b>4. Procesos de agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI-TOF de PAHs y asfaltenos</b>   | <b>65</b> |
| 4.1. Introducción . . . . .  | 66        |
| 4.1.1. Objetivos . . . . .   | 66        |
| 4.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos . . . . .   | 67        |
| 4.1.3. Asfaltenos . . . . .  | 69        |
| 4.2. Análisis LDI-TOF de PAHs . . . . .  | 72        |
| 4.2.1. Aspectos Metodológicos . . . . .  | 72        |
| 4.2.2. Discusión de resultados . . . . .   | 72        |
| Agregación supramolecular (I). Efecto de la densidad de la pluma. . . . .  | 72        |
| Agregación supramolecular (II). Efecto de las condiciones de extracción de iones. .  | 74        |
| Agregación supramolecular (III). Efecto del tamaño y grado de pericondensación del sistema aromático. . . . .                                    | 74        |
| Agregación supramolecular (IV). Efectos derivados de la presencia de heteroátomos y de cadenas laterales en la estructura poliaromática. . . . . | 74        |
| 4.3. Análisis LDI-TOF de asfaltenos . . . . .  | 77        |
| 4.3.1. Aspectos Metodológicos . . . . .  | 77        |
| 4.3.2. Discusión de resultados . . . . .   | 78        |

|   |            |
|---|------------|
| Optimización del método de preparación de muestras y caracterización fiable de la<br>distribución de masas de los asfaltenos. . . . . | 81         |
| 4.4. Conclusiones . . . . .   | 86         |
| Referencias . . . . .   | 89         |
| <b>5. Caracterización de asfaltenos mediante experimentos de desorción/posicionización lá-<br/>ser</b>                                | <b>97</b>  |
| 5.1. Introducción . . . . .   | 98         |
| 5.1.1. Objetivos . . . . .  | 99         |
| 5.2. Discusión de resultados . . . . .  | 99         |
| 5.2.1. Aspectos técnicos y metodológicos . . . . .  | 99         |
| 5.2.2. Experimentos UV-LDI . . . . .  | 99         |
| 5.2.3. Experimentos IR-LDI . . . . .  | 100        |
| 5.2.4. Experimentos UV/UV-L2MS . . . . .  | 100        |
| 5.2.5. Experimentos IR/UV-L2MS . . . . .  | 102        |
| 5.2.6. Mecanismos de agregación en procesos de desorción láser ultravioleta e infrarroja .  | 102        |
| 5.3. Conclusiones . . . . .   | 104        |
| Referencias . . . . .   | 107        |
| <b>6. Aplicación de líquidos iónicos como matrices MALDI en la detección de hidrocarbu-<br/>ros</b>                                   | <b>111</b> |
| 6.1. Introducción . . . . .   | 112        |
| 6.1.1. Objetivos . . . . .  | 112        |
| 6.1.2. Síntesis de líquidos iónicos y preparación de muestras . . . . .   | 112        |
| 6.2. Discusión de resultados . . . . .  | 113        |
| 6.3. Conclusiones . . . . .   | 114        |
| Referencias . . . . .   | 117        |

## II Interacciones supramoleculares en experimentos de espectroscopia multifotónica resonante en el infrarrojo medio 119

### 7. Introducción 121

|  |     |
|--|-----|
| 7.1. Motivación, antecedentes y objetivos generales del bloque . . . . .   | 122 |
| 7.2. Agregados supramoleculares de éteres-corona . . . . .   | 122 |
| 7.2.1. Éteres-corona y reconocimiento molecular . . . . .  | 122 |
| 7.2.2. Complejos de éteres-corona y cationes alcalinos . . . . .   | 123 |
| 7.2.3. Complejos de éteres-corona y cationes moleculares ( $\text{NH}_4^+$ y $\text{H}_3\text{O}^+$ ) . . . . .              | 124 |
| 7.3. Simetría molecular . . . . .  | 125 |
| 7.3.1. Elementos de simetría . . . . .   | 125 |
| 7.3.2. Operaciones de simetría . . . . .   | 126 |
| 7.3.3. Isomería y quiralidad . . . . .   | 127 |
| 7.4. Análisis conformacional de complejos supramoleculares . . . . .   | 128 |
| 7.4.1. Transferencia a la fase gaseosa e ionización de los complejos polímero-catión . . .                                   | 128 |
| 7.4.2. Espectroscopia de disociación multifotónica en el infrarrojo medio . . . . .  | 129 |
| 7.4.3. Metodología empleada para la caracterización estructural de los complejos de inclusión de los éteres-corona . . . . . | 130 |
| Referencias . . . . .  | 133 |

### 8. Análisis estructural de los complejos del éter-corona 18Crown6 y cationes alcalinos 137

|  |     |
|--|-----|
| 8.1. Introducción . . . . .            | 138 |
| 8.1.1. Objetivos . . . . .             | 138 |
| 8.2. Metodología . . . . .             | 139 |
| 8.3. Discusión de resultados . . . . . | 140 |
| 8.3.1. 18c6- $\text{K}^+$ . . . . .    | 144 |
| 8.3.2. 18c6- $\text{Cs}^+$ . . . . .   | 144 |
| 8.3.3. 18c6- $\text{Na}^+$ . . . . .   | 146 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 8.3.4.     | 18c6-Li <sup>+</sup> . . . . .  | 146        |
| 8.3.5.     | Atropoisomerismo . . . . .  | 148        |
| 8.4.       | Conclusiones . . . . .  | 148        |
|            | Referencias . . . . .   | 149        |
| <b>9.</b>  | <b>Análisis estructural de complejos del éter–corona 15Crown5 y cationes alcalinos</b>                                | <b>153</b> |
| 9.1.       | Introducción . . . . .  | 154        |
| 9.1.1.     | Objetivos . . . . .   | 154        |
| 9.2.       | Metodología . . . . .   | 154        |
| 9.3.       | Discusión de resultados . . . . .   | 155        |
| 9.3.1.     | Complejos binarios 15c5-M <sup>+</sup> (M=K, Rb, Cs) . . . . .  | 155        |
| 9.3.2.     | Complejos ternarios 15c5-K <sup>+</sup> –15c5 . . . . .   | 160        |
| 9.4.       | Conclusiones . . . . .  | 162        |
|            | Referencias . . . . .   | 165        |
| <b>10.</b> | <b>Análisis estructural de complejos de éteres–corona con H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | <b>169</b> |
| 10.1.      | Introducción . . . . .  | 170        |
| 10.1.1.    | Objetivos . . . . .   | 170        |
| 10.2.      | Metodología . . . . .   | 170        |
| 10.3.      | Discusión de resultados . . . . .   | 171        |
| 10.4.      | Conclusiones . . . . .  | 178        |
|            | Referencias . . . . .   | 181        |
| <b>11.</b> | <b>Análisis estructural de complejos éteres–corona/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de naturaleza quiral</b>                | <b>185</b> |
| 11.1.      | Introducción . . . . .  | 186        |
| 11.1.1.    | Objetivos . . . . .   | 186        |
| 11.2.      | Metodología . . . . .   | 187        |

|   |     |
|---|-----|
| 11.3. Discusión de resultados . . . . . | 187 |
| 11.4. Conclusiones . . . . .            | 192 |
| Referencias . . . . .                   | 195 |



---

## Índice de figuras

---

|  |    |
|--|----|
| 1.1. Ilustración del proceso de desorción/ionización láser de una muestra. . . . .   | 6  |
| 2.1. Sistema experimental empleado en los experimentos LDI/MALDI-TOF. . . . .  | 25 |
| 2.2. Esquema del espectrómetro de masas del equipo LDI/MALDI. . . . .  | 27 |
| 2.4. Esquema del conjunto de placas de la fuente de iones . . . . .  | 27 |
| 2.5. Esquema del sistema experimental empleado en experimentos de “pos-ionización” de especies neutras. . . . .                  | 27 |
| 2.3. Esquema de la cámara de desorción/ionización del equipo LDI/MALDI. . . . .  | 28 |
| 2.6. Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). .   | 29 |
| 2.7. Espectro MALDI-TOF de PAHs empleados como patrones para calibrar el equipo. . . . .   | 30 |
| 2.8. Representación gráfica del tiempo de vuelo de los patrones frente a la raíz cuadrada de la masa en cada caso. . . . .       | 30 |
| 2.9. Conexiones entre los distintos componentes del sistema experimental. . . . .  | 31 |
| 2.10. Efecto de la extracción pulsada de iones sobre la resolución en masas. . . . .   | 32 |
| 2.11. Efecto de la variación del tiempo de retraso entre la generación y extracción iónica sobre la resolución en masas. . . . . | 32 |
| 2.12. Efecto del modo de extracción iónica del equipo (continua vs pulsada) en la formación de agregados. . . . .                | 33 |
| 2.13. Espectros de absorbancia UV-visible de las matrices 2,4 y 2,5 DHB, $\alpha$ -CHCA y ditranol. .                            | 37 |
| 2.14. Espectros MALDI del coroneno medidos en muestras preparadas mediante <i>solvent-free</i> y <i>dried-droplet</i> . . . . .  | 39 |

|  |    |
|--|----|
| 2.15. Espectros LDI/MALDI del coroneno en estado puro y diluido con una sal (LiBr) y la matriz ditranol. . . . .   | 40 |
| 2.16. Denominación, fórmula, peso molecular y estructura del glicerol, la butilamina, la tributilamina y la 3-aminoquinolina. . . . .  | 41 |
| 2.17. Espectro de absorción UV-visible de los líquidos iónicos sintetizados . . . . .  | 42 |
| 2.18. Fotografías de muestras preparadas mediante los tres métodos utilizados en este trabajo: <i>dried-droplet</i> , <i>solvent-free</i> y uso de líquidos iónicos como matrices. . . . . | 43 |
| 2.19. Espectros MALDI de angiotensina I medidos en muestras preparadas mediante <i>dried-droplet</i> , <i>solvent-free</i> y empleando líquidos iónicos como matriz. . . . .               | 43 |
| 3.1. Isómeros del anillo triazínico. . . . .   | 49 |
| 3.3. Espectros de absorbancia ultravioleta-visible de las triazinas estudiadas . . . . .   | 49 |
| 3.2. Denominación, fórmula, peso molecular y estructura de las clorotriazinas y mercaptotriazinas analizadas en este estudio. . . . .  | 50 |
| 3.4. Espectros LDI de las triazinas analizadas en este estudio . . . . .   | 52 |
| 3.5. Estructura detallada de los picos del espectro LDI de la atrazina correspondientes al ion padre y sus principales fragmentos . . . . .  | 54 |
| 3.6. Estructura detallada de los picos del espectro LDI de la atrazina correspondientes a los dímeros y trímeros formados . . . . .  | 56 |
| 3.7. Espectros MALDI de la atrazina empleando 2,4-DHB y $\alpha$ -CHCA como matrices . . . . .   | 57 |
| 4.1. Diferentes estructuras conformacionales típicas de los PAHs . . . . .   | 67 |
| 4.2. Denominación, fórmula, peso molecular y estructura de los hidrocarburos aromáticos analizados en este estudio. . . . .  | 68 |
| 4.4. Estructuras moleculares modelo de los asfaltenos. Modelo isla vs modelo archipiélago. . . . .   | 69 |
| 4.3. Espectros de absorbancia ultravioleta de PAHs . . . . .   | 70 |
| 4.5. Espectros de absorbancia UV-visible de los asfaltenos ALCO, extraído del petróleo, e lino, procedente del carbón. . . . .   | 72 |
| 4.6. Espectros LDI/MALDI del coroneno medidos en muestras preparadas mediante <i>dried-droplet</i> y <i>solvent-free</i> . . . . .   | 73 |
| 4.7. Espectros LDI de PAHs sin sustituyentes. . . . .  | 75 |
| 4.8. Espectros LDI de PAHs con heteroátomos y cadenas alifáticas laterales. . . . .  | 76 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.9. Espectros LDI del asfalto ALCO medidos sobre muestras con distinta densidad superficial promedio. . . . .  | 79  |
| 4.10. Espectros LDI del asfalto PREHCO obtenidos en modo de extracción pulsada y continua de iones. . . . .   | 80  |
| 4.11. Espectros LDI/MALDI del asfalto PREHCO . . . . .  | 80  |
| 4.12. Espectros LDI del asfalto PREHCO medidos sobre muestras obtenidas a partir de la transferencia de películas finas preparadas en la interfase aire/agua. . . . .   | 83  |
| 4.13. Espectros MALDI del asfalto ALCO . . . . .  | 84  |
| 4.14. Espectros LDI del asfalto Iino, extraído del carbón. . . . .  | 85  |
| 5.1. Espectros de absorbancia ultravioleta e infrarrojo del asfalto UG8 . . . . .   | 98  |
| 5.2. Espectros UV-LDI e IR-LDI del asfalto UG8 . . . . .  | 100 |
| 5.3. Espectros UV/UV-L2MS del asfalto UG8 . . . . .   | 101 |
| 5.4. Señal integrada de la corriente de iones detectada en los experimentos UV/UV-L2MS e IR/UV-L2MS del asfalto UG8 registrada al aplicar distintos retrasos temporales entre los pulsos láser de desorción y posionización . . . . . | 101 |
| 5.5. Espectros IR/UV-L2MS del asfalto UG8 . . . . .   | 102 |
| 6.1. Espectros de absorbancia UV-Visible del asfalto UG8 y el líquido iónico CAG empleado como matriz MALDI. . . . .  | 113 |
| 6.2. Espectro MALDI del asfalto UG8 utilizando CAG como matriz . . . . .  | 114 |
| 7.1. Representación esquemática de los éteres-corona 18-crown-6, 15-crown-5 y (18-crown-6)-2,3,11,12-ácido carboxílico . . . . .  | 123 |
| 7.2. Espectros MALDI <i>solvent-free</i> del 18-crown-6 con sales alcalinas . . . . .   | 125 |
| 7.3. Esquema de la ionización por electronebulización (ESI) . . . . .   | 129 |
| 8.1. Espectros ESI-FT-ICR IRMPD de los complejos 18c6-M <sup>+</sup> (M= Cs, K, Na, Li) . . . . .   | 141 |
| 8.2. Análisis detallado de la banda asociada a la tensión C–O de los complejos 18c6-M <sup>+</sup> . . . .  | 144 |
| 8.3. Representación gráfica de la geometría de equilibrio de los complejos 18c6-M <sup>+</sup> que predice el cálculo B3LYP. . . . .  | 145 |
| 8.4. Representación gráfica de la geometría de equilibrio que predice el cálculo B3LYP/6-31++G** para los dos atropoisómeros del complejo 18c6-Li(D <sub>2</sub> ). . . . .   | 147 |

|   |     |
|---|-----|
| 9.1. Representación de los conformeros de menor energía según el cálculo B3LYP/6-31++G** para los complejos 15c5-K <sup>+</sup> , PEG4-K <sup>+</sup> y PEG9-K <sup>+</sup> . . . . .   | 157 |
| 9.2. Espectros IR de los complejos 15c5-Cs <sup>+</sup> , 15c5-Rb <sup>+</sup> , 15c5-K <sup>+</sup> , PEG4-K <sup>+</sup> y PEG9-K <sup>+</sup> medidos experimentalmente (IRMPD) y calculados de forma teórica (B3LYP/6-31++G**). . . | 158 |
| 9.3. Representación de dos conformeros en estado excitado según el cálculo B3LYP del complejo PEG9-K <sup>+</sup> . . . . .   | 159 |
| 9.4. Espectros IRMPD de los complejos 15c5-K <sup>+</sup> y 15c5-K <sup>+</sup> -15c5 . . . . .   | 160 |
| 9.5. Detalle de la banda asociada a la vibración del C-O en los espectros IRMPD y B3LYP de los complejos 15c5-K <sup>+</sup> y 15c5-K <sup>+</sup> -15c5, y del 15c5 en estado libre. . . . .   | 161 |
| 9.6. Representación gráfica de la estructuras geométrica de equilibrio que predice el cálculo DFT-B3LYP/6-31G* para el complejo ternario 15c5-K <sup>+</sup> -15c5. . . . .   | 161 |
| 10.1. Espectros infrarrojo de los complejos 18c6-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y 18c6-H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> . . . . .  | 173 |
| 10.2. Espectros infrarrojo de los complejos 15c5-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y su variante deuterada 15c5ND <sub>4</sub> <sup>+</sup> . . .  | 173 |
| 10.3. Espectros infrarrojo del complejo 15c5-H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> y su variante deuterada 15c5-D <sub>3</sub> O <sup>+</sup> . . . . .   | 174 |
| 10.4. Representación gráfica de los conformeros de menor energía de los complejos del 18c6 con NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> , resultado del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). . . . .                         | 177 |
| 10.5. Representación gráfica de los conformeros más estables de los complejos del 15c5 con NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> resultantes del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). . . . .                             | 178 |
| 11.1. Representación esquemática de la estructura molecular de uno de los enantiómeros (+) del éter-corona de naturaleza quiral: (18-crown-6)-2,3,11,12-ácido tetracarboxílico . . . . .  | 186 |
| 11.2. Representación del conformero más estable (1) del complejo en fase gaseosa 18c6H <sub>4</sub> -NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> resultante del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p). . . . .   | 189 |
| 11.3. Representación de los conformeros de menor energía del complejo 18c6H <sub>4</sub> -NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> con estructuras de tipo “cuenco” resultado del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p). . . . .                            | 190 |
| 11.4. Espectro ESI-FT-ICR IRMPD del complejo en estado gaseoso (18c6H <sub>4</sub> )-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> . . . . .   | 191 |

---

## Indice de tablas

---

|  |     |
|--|-----|
| 2.1. Denominación y peso molecular de PAHs empleados como patrones para el calibrado en masas del equipo. . . . .  | 31  |
| 2.2. Intervalo de emisión del sistema OPO/OPA. . . . .   | 36  |
| 2.3. Denominación, fórmula, peso molecular y absorptividad molar de las matrices MALDI empleadas. . . . .  | 38  |
| 3.1. Principales fragmentos observados en espectros LDI de clorotriazinas . . . . .  | 53  |
| 3.2. Principales fragmentos observados en espectros LDI de mercaptotriazinas . . . . .   | 53  |
| 8.1. Asignación de los modos vibraciones correspondientes a las principales bandas observadas en los espectros IRMPD de los complejos 18c6-M <sup>+</sup> . . . . .  | 140 |
| 8.2. Valores de energía libre (kJ mol <sup>-1</sup> ) de los conformeros del 18c6-M <sup>+</sup> . . . . .   | 142 |
| 8.3. Principales parámetros geométricos de los conformeros más estables de los complejos 18c6-M <sup>+</sup> que predicen los cálculos B3LYP/6-31++G**, B3LYP/cc-pVDZ y MP2/6-31G*. . . .  | 143 |
| 9.1. Asignación de los modos vibracionales correspondientes a las principales bandas observadas en los espectros IRPMD de los complejos 15c5-M <sup>+</sup> y PEG-K <sup>+</sup> . . . . .   | 156 |
| 9.2. Parámetros geométricos principales de los conformeros 15c5-Cs,Rb,K <sup>+</sup> , PEG4-K <sup>+</sup> y PEG9-K <sup>+</sup> más estables que predice el cálculo B3LYP/6-31++G**. . . . .  | 157 |
| 9.3. Parámetros estructurales del 15c5 libre y el complejo ternario 15c5-K <sup>+</sup> -15c5, resultantes del cálculo teórico DFT/B3LYP/6-31G*. . . . .   | 161 |
| 10.1. Asignación de los modos vibracionales, según el cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), de las principales bandas observadas en los espectros IRMPD de los complejos del 15c5 y el 18c6 con amonio, hidronio y sus variantes deuteradas. . . . . | 172 |

|   |     |
|---|-----|
| 10.2. Principales parámetros estructurales de los tres confórmeros de menor energía de los complejos del 15c5 y el 18c6 con $\text{NH}_4^+$ e $\text{H}_3\text{O}^+$ , que resultan del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). | 175 |
| 11.1. Modos vibracionales asignados mediante cálculos B3LYP/6-311++G(2d,2p) a las principales bandas observadas en los espectros IRMPD del complejo $18\text{c6H}_4\text{-NH}_4^+$ .                                | 188 |

---

## Agradecimientos

---

En los casi siete años que han pasado desde que inicié este proyecto, son tantas las personas que se han cruzado en mi vida, y que de un modo u otro han contribuido a su consecución, que va a ser difícil recoger su esencia para plasmarla en unas pocas líneas. Unos, los incondicionales, siguieron estando ahí, y siempre estarán ahí. Otros, han aparecido para quedarse. Y muchos se cruzaron en mi camino solo a ratos pero también dejaron su huella. Pero empecemos por el principio.

El culpable de enredarme en el mundillo investigador, y hacer de la química física una de mis pasiones, aunque esto último sea difícil de creer, eres tú, Bruno. A ti te debo la mayoría de lo que sé, la capacidad de estar en cien cosas a la vez y el haber trabajado en un ambiente insuperable. Siempre me has contagiado de tu entusiasmo. Y me encanta que todo esto nos haya llevado a ser cada vez más amigos. En estos años, Ana también ha sido un pilar fundamental en tantos días de trabajo y estudio. Gracias por tantos ratos buenos, tantas risas, tanta compenetración, y por toda la ayuda que me has prestado. Paco, definitivamente, hubo un antes y un después de tu llegada a nuestro mundo. En cuanto nos cogimos el ritmo, hicimos una buena pareja. Y sigo con los excorpio: ¡Paula! Cómo te hecho de menos. Esos cafés de media mañana no hubieran sido lo mismo sin ti. Marta, gracias por caernos tan bien desde el principio, aunque no estuvieses mucho tiempo en la UPO, me acuerdo mucho de ti. A Silvia le cogí el testigo y gracias a ella durante un tiempo intenté hacer la vida de los becarios un poco más justa, pero eso es otra historia... con todos los compañeros del área instauramos el día del becario, y pasamos muy buenos ratos.

Volviendo al principio, cuando empecé los cursos de doctorado estaba de erasmus en Nantes. Allí en Francia conocí a dos soles, Ibone y Ana, que fueron mi familia durante un año, y seguimos siendo inseparables. En aquellos días me animaron a seguir adelante con todo esto.

Y esto me lleva al Quimiláser, ¿cómo definir el paso por el Quimiláser? Fue una experiencia extraordinaria, de la que me traje un montón de material incomprensible, que he llegado a descifrar con el paso de los años, unos profesores de los que aprendí bastante y sobre todo una gente estupenda. Qué risas, qué fiestas... Jon, Iker, Jose, Carlos, Isa, Lorena, Andrés y tantos otros que dejo por nombrar, os agradezco el buen recuerdo que tengo de aquellos días. Los quimilaseros siempre me han echado una mano cuando me atascaba en el laboratorio. Y también otros, como Jesús de la Complu, que me acercó un poco más al “maravilloso” mundo del LabView durante una buena temporada.

Lo mismo puedo decir de la gente con la que he trabajado fuera. En Oxford tuve la gran suerte de compartir muchas mañanas de discusión con John Simons, del que aprendí muchísimo. Lo mismo puedo decir de Cristina y Emilio, que hicieron mi estancia en Oxford de los más productiva y de lo más divertida. Del tiempo que pasé en Colonia, estoy muy agradecida al profesor Stephan Schlemmer y a Oscar, por su gran dedicación. Gracias también a Jos Oomens y a Jeff Steill, con los que he realizado buena parte de los experimentos de espectroscopía láser infrarroja que cuento más adelante, y con los que he pasado en Holanda, en el FOM, unas jornadas de trabajo muy intensas para aprovechar FELIX al máximo.

Y volviendo a la UPO, no puedo dejar de agradecer a mis botánicos, Pedro, Mónica, Santi, Marcial y Paco, que me hayan alegrado el desayuno y el almuerzo de casi todos los días. Lo mismo digo de Antonia, Marisa, Carmen y Luís. Ahora que no estoy por allí, os echo mucho de menos.

Los últimos meses de trabajo en el laboratorio los pasé con boda y embarazo de por medio. Casi dos años después, lo que he tardado en redactar estas páginas, son ya tres las “jotas” que llenan mi vida de vida. Jose, gracias por tu paciencia, por tu confianza en que algún día podría acabar con todo esto, por animarme todas las veces que he pensado en dejarlo, y por cuidar de Julio y Javier tantas noches que me he quedado delante del ordenador. Créeme, sin ti, no hubiera terminado todavía. Y sin las abuelas tampoco. Gracias mamá, gracias Maribel, por cuidar de mis enanos durante tantos días para que yo pudiera escribir. Gracias Ale, por quedarte en casa tantas veces y hacerme tantos favores. Abel, gracias por nuestros desayunos de confianzas; ¡cogía aire para toda la semana! Amigas, Patri, Vir, Cristi, Susana, Isa, Angeles, Fiby, M<sup>a</sup> Angeles, Bárbara, María. Gracias por aguantarme y por darme tantos ánimos, y por hacerme reír tanto. Bea, Chari, Maribel, también vosotras me habéis empujado un poquito.

En mi caso, este proyecto ha sido mío y un poquito de todos. Con esto cierro una etapa de mi vida en la que lo personal y lo profesional ha estado íntimamente ligado, una etapa de la que muchos formáis parte. ¡Gracias otra vez!

a mis padres...





---

## Prefacio

---

A lo largo de las últimas décadas se han realizado grandes avances en el desarrollo de diferentes técnicas para el estudio de sistemas moleculares de interés químico, ambiental y biotecnológico y su capacidad para establecer interacciones supramoleculares de diversa naturaleza. En este contexto, destaca la evolución que han experimentado la espectrometría de masas y las técnicas láser, y su aplicación a la caracterización y análisis de moléculas de diversa complejidad.

El descubrimiento y desarrollo del láser en la segunda mitad del siglo XX constituyó una auténtica revolución tecnológica, reconocida con el Premio Nobel de Física en 1961 a C. H. Townes, N. Basov y A. Prokhorov. En los años 70 existía una demanda importante de nuevas técnicas de espectrometría de masas aplicadas a la detección y caracterización de macromoléculas y de sus agregados supramoleculares. En estos años aparecieron en la literatura unos pocos artículos sobre técnicas láser acopladas con espectrometría de masas que probablemente influyeron en el posterior desarrollo de aplicaciones de la tecnología láser a multitud de campos de la química, reconocidos también con premios Nobel como los otorgados a A. Schawlow y N. Bloembergen en 1981 por el desarrollo de la espectroscopia láser, a A. Zewail en 1999 por sus aportaciones a la femtoquímica, a K. Tanaka en 2002 por la desorción/ionización láser asistida por matriz y a Hänsch y Hall en 2005 por su contribución a la espectroscopia láser de alta precisión, entre otros.

Las investigaciones que se presentan en esta memoria son el resultado de parte del trabajo que ha realizado nuestro grupo en los últimos años, enfocado al estudio de las interacciones supramoleculares que se establecen en sistemas de diversa naturaleza mediante la aplicación de técnicas láser y de espectrometría de masas. En concreto, en el marco del proyecto de tesis doctoral, se han investigado aspectos fundamentales de los procesos de agregación supramolecular en diversos sistemas moleculares modelo. Por un lado, se han estudiado procesos de agregación por apilamiento en triazinas (heterociclos nitrogenados) e hidrocarburos aromáticos policíclicos, aplicando los resultados y conclusiones obtenidos en el último caso a la caracterización de asfaltenos (componentes más pesados del petróleo y el carbón). Por otra parte, se han caracterizado complejos de inclusión formados por éteres-corona de distinto tamaño de cavidad con metales alcalinos y con cationes moleculares, como el hidronio y el amonio, así como complejos análogos constituidos por un hospedador de naturaleza quiral.

En la investigación se han utilizado técnicas de vanguardia de desorción/ionización láser y de espectroscopia láser infrarroja, acopladas con espectrometría de masas. La investigación experimental se complementó con la realización de cálculos teóricos químico cuánticos para la asignación estructural de los espectros obtenidos en el laboratorio.

En los experimentos de desorción/ionización láser se ha empleado un equipo LDI/MALDI-TOF de fabricación propia y láseres sintonizables en la región del ultravioleta y el infrarrojo disponibles en nuestro laboratorio. El proyecto de tesis contempla un análisis detallado de los aspectos metodológicos de esta

tecnología (preparación de muestras, potencia láser, extracción de iones) que afectan a los fenómenos de agregación.

Los experimentos de espectroscopía láser enfocados a la caracterización conformacional de complejos de inclusión polímero–catión se han llevado a cabo en estancias cortas (de hasta 3 meses) en el Instituto FOM de Física de Plasmas (Holanda), en el Laboratorio de Química Física y Teórica de la Universidad de Oxford (UK) y en el Instituto de Física de la Universidad de Colonia (Alemania) .

Debido a que se han empleado dos metodologías distintas para abordar el estudio de las interacciones supramoleculares, la memoria se estructura en dos bloques, el primero de los cuales recoge los experimentos de desorción/ionización láser acoplada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LDI/MALDI-TOF) para la caracterización de triazinas, hidrocarburos poliaromáticos y asfaltenos y sus agregados supramoleculares, mientras que el segundo bloque, se centra en la caracterización de los complejos de inclusión de éteres cíclicos con cationes de diversa naturaleza, mediante la utilización de espectroscopia láser de disociación multifotónica en el infrarrojo medio. A pesar de esta división, los contenidos de ambos bloques están interconectados, ya que los resultados y conclusiones de estudios espectroscópicos que se exponen en la segunda parte de la memoria, constituyen una prolongación de las líneas de investigación previas de nuestro grupo sobre agregación supramolecular aplicando técnicas LDI/MALDI.

---

## Resumen de conclusiones

---

**1. De las investigaciones realizadas en el marco de esta tesis doctoral, con el objetivo de estudiar las interacciones supramoleculares que se establecen en heterociclos nitrogenados, hidrocarburos poliaromáticos y asfaltenos, mediante la aplicación de técnicas de desorción/ionización láser y de espectrometría de masas, se pueden extraer las siguientes conclusiones.**

\* En el proceso LDI de triazinas el grupo que ocupa la posición 2 del anillo (átomo de cloro y grupo metil-tio) influye de forma clara en la estabilidad de la molécula, siendo más estables aquellas que poseen como sustituyente el azufre frente al cloro. En el caso de las cloro-triazinas se produce de forma muy eficiente la pérdida del átomo de cloro, seguida de la desalquilación parcial o total de las cadenas laterales y de la ruptura del anillo triazínico. El fragmento declorado es el más abundante, y junto con el ion padre, forma parte de los agregados de hasta 7 unidades que dominan los espectros de masas en todos los casos, siendo mayor su abundancia en los complejos más ligeros (y la del ion padre en los de mayor tamaño). En las mercapto-triazinas en cambio, se produce la desalquilación parcial de la molécula, previa a la pérdida del grupo metil-tio, debido a la mayor estabilidad que aporta a la misma el grupo metil-tio. Como resultado, se generan de forma eficiente múltiples fragmentos (con abundancias similares) que mantienen el átomo de azufre y que se asocian para formar gran variedad de complejos de hasta 4 unidades.

\* Los complejos covalentes (polimerización) surgen de la asociación de radicales producidos en estadios tempranos del proceso LDI, a través de enlaces cruzados de las cadenas laterales. Los de naturaleza no covalente, pueden relacionarse con configuraciones en columna estabilizadas por interacciones intermoleculares de tipo puentes de hidrógeno entre los grupos amino laterales, asistidas por interacciones electrónicas de tipo  $\pi$  entre los anillos triazínicos.

\* Los experimentos LDI/MALDI-TOF realizados en hidrocarburos poliaromáticos modelo muestran que las interacciones de tipo  $\pi$  son capaces de promover eficientemente por sí mismas la agregación en la pluma. En ausencia de grupos polares y cadenas laterales en la estructura molecular, la tendencia a formar agregados correlaciona bien con el tamaño del sistema policondensado y con su grado de pericondensación, en acuerdo cualitativo con predicciones teóricas previas. En cambio, la presencia de cadenas alifáticas laterales —efectos estéricos— y de heteroátomos y grupos polares como sustituyentes del carbono en el sistema de anillos, dificulta la formación de agregados.

\* Tanto los PAHs como los asfaltenos agregan eficientemente en el proceso LDI, favoreciéndose dicho efecto al aumentar la densidad de la muestra y la potencia láser, y al operar en condiciones de extracción continua de iones. Este último efecto puede interpretarse como una consecuencia de la mejora de las colisiones, inducidas por la aceleración de los iones formados durante los estadios iniciales del proceso de desorción a través del entorno densamente poblado de la pluma de desorción.

\* De forma práctica se concluye que la distribución de masas obtenida en experimentos LDI-MS de mezclas complejas y polidispersas de compuestos con alta tendencia a agregar entre sí, tales como los asfaltenos que se han investigado, depende de las condiciones experimentales empleadas. La supresión de los procesos de agregación, requerida para la determinación fiable de tales distribuciones de masas, demanda una reducción de las colisiones en la pluma de desorción. Esto puede alcanzarse con métodos de preparación de muestras apropiados que proporcionen una dilución eficiente del analito, así como con energías lo suficientemente bajas de los pulsos láser en el proceso de desorción. Entre estos métodos se ha empleado la formación controlada de películas ultrafinas de asfalto en la interfase aire/agua con excelentes resultados.

\* En experimentos IR-LDI de asfaltenos la formación de agregados se reduce significativamente, debido presumiblemente a dos efectos complementarios: (i) una reducción drástica de los fragmentos reactivos, que da lugar a una oligomerización covalente y (ii) la pobre estabilización de los agregados no covalentes, debida al recalentamiento del material en condiciones de confinamiento térmico y por estrés, que se producen por la irradiación de la muestra con radiación láser infrarroja.

\* Cuando se realizan experimentos de desorción y posterior ionización de neutros con dos láseres, del tipo UV/UV-L2MS o IR/UV-L2MS, los efectos de agregación también se suprimen drásticamente, incluso en muestras densas, lo cual también puede atribuirse en gran medida a las bajas fluencias empleadas para la desorción de las muestras de asfalto, lo que implica una baja densidad de material en la pluma, reduciéndose el número de colisiones efectivas.

---

\* El análisis LDI de asfaltenos procedentes del carbón y del petróleo revela que los primeros son más ligeros, presentando para el monómero un peso molecular promedio de 500 y 600-800 uma, respectivamente. Se detectaron agregados estables de asfaltenos a partir del análisis LDI de muestras densas, obteniéndose distribuciones bimodales con pesos moleculares promedio para ambas bandas de 2200-3100 y 15000-19000 uma, respectivamente. Estos resultados sugieren que el proceso de agregación, desde el monómero hasta *clusters* de un número de unidades cada vez mayor, tiene lugar de forma jerárquica, paso a paso, mediante la estabilización de agregados de tamaño creciente, que provocan la formación de disposiciones nanométricas, que forman los cimientos para las estructuras más pesadas.

\* Considerando de forma global los resultados obtenidos en la investigación de PAHs y asfaltenos y teniendo en cuenta que (1) al aumentar el número de anillos fusionados en un hidrocarburo poliaromático se incrementa su tendencia a formar agregados, que (2) las cadenas alifáticas que aparecen en la estructura molecular inhiben la agregación en la pluma y que (3) ambos tipos de asfaltenos —del petróleo y el carbón— exhiben una tendencia significativa a formar agregados, podemos concluir que deben poseer en su estructura un núcleo aromático policondensado de gran tamaño, con un sistema de entre cuatro y diez anillos fusionados, aunque alguna fracción pueda poseer sistemas aromáticos de distinto tamaño.

\* Puesto que los asfaltenos procedentes del petróleo experimentan una mayor tendencia a formar agregados que los extraídos del carbón, al mismo tiempo que poseen una mayor cantidad de alcanos en su estructura (que potencia los efectos estéricos) también podemos decir que los PAHs que los constituyen serán de mayor tamaño que los que poseen los asfaltenos del carbón. La conjunción de PAHs grandes con los pesos moleculares promedio relativamente bajos que presentan los asfaltenos apoya el modelo “isla”, siendo inconsistentes los resultados obtenidos en este trabajo con los sistemas de anillos de pequeño tamaño unidos por enlaces cruzados que postula el modelo “archipiélago”.

---

\* Desde un punto de vista metodológico, en primer lugar, la preparación de muestras libres de disolvente (método *solvent-free*) se ha aplicado con éxito en experimentos LDI/MALDI de triazinas, PAHs y asfaltenos, garantizando que los procesos de agregación de las especies estudiadas ocurran de forma

predominante en estado gaseoso, en la pluma de desorción, y eliminando las dificultades asociadas al análisis de compuestos muy poco solubles, o de muestras con componentes de distinta polaridad. En segundo lugar, la dilución de los analitos de interés, bien con matrices MALDI, bien con sales inorgánicas, suprime la formación de complejos en la pluma de forma eficiente, como consecuencia de la reducción en el número de colisiones de asociación que tienen lugar en la fase gaseosa. Por último, se han empleado con buen resultado líquidos iónicos como matrices MALDI en la determinación de las distribuciones de masas de los asfaltenos, demostrándose su eficacia para la detección de especies derivadas del carbono.

---

---

**A partir del estudio de los complejos formados en fase gaseosa por éteres-corona de distinto tamaño de cavidad, y cationes alcalinos y moleculares (hidronio y amonio), mediante espectroscopía láser infrarroja de disociación multifotónica combinada con cálculos mecanocuánticos, podemos concluir que:**

\* El éter-corona 18c6 se consolida como modelo para la comprensión y tratamiento experimental y teórico de los complejos de inclusión que poseen esqueletos moleculares del hospedador flexibles, permitiendo la adopción de conformaciones distintas en función del huésped con el que interactúe.

\* El análisis de los complejos 18c6-M<sup>+</sup> (M = Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>) muestra como los conformeros de menor energía maximizan las fuerzas atractivas entre el catión y los pares de electrones solitarios de los oxígenos de la estructura del poliéter, a la vez que minimizan las repulsiones de estos últimos entre sí, mediante la adopción de estructuras del esqueleto del éter-corona de tipo abierto, en el caso de los cationes de mayor tamaño (Cs<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) y estructuras plegadas en torno al catión, en el caso de los más pequeños (Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>). Estos conformeros, excepto en el caso del Na<sup>+</sup>, corresponden a disposiciones simétricas y de naturaleza quiral. Las estructuras más cerradas del éter de los complejos con los cationes más ligeros deberían mantener su estabilidad en disolventes de baja polaridad, mientras que las más abiertas, y por tanto más accesibles a la hidratación parcial del catión, ganarían relevancia en disolución acuosa.

---

\* En el caso de los complejos de tipo 15c5-M<sup>+</sup> (M = K, Rb, Cs) los espectros registrados experimentalmente se corresponden con estructuras piramidales del esqueleto del éter-corona de carácter asimétrico, en las cuales el catión se coloca sobre el anillo. Esto se debe al mayor tamaño de los cationes (mayor radio iónico) en comparación con el tamaño de la cavidad del éter. El polímero en estos casos, minimiza la energía libre de la estructura, orientando cuatro de los oxígenos de la cavidad hacia el catión que se dispone por encima del anillo, y colocando el quinto oxígeno hacia la cara opuesta del mismo. Esta estructura da lugar a la pequeñas diferencias entre las distancias oxígeno-catión de los distintos complejos 15c5-M<sup>+</sup> estudiados.

\* La comparación de estos resultados con los de estudios análogos de complejos PEG4 y PEG9 con K<sup>+</sup> realizados por nuestro grupo, apoya la afirmación de que la flexibilidad de la cadena del polímero es un factor fundamental en la disposición estructural de los complejos polímero-catión. En el caso del complejo PEG4-K<sup>+</sup> se forma un complejo de inclusión en el que el polímero se pliega en torno al catión, adoptando una disposición prácticamente plana en la que cuatro oxígenos rodean al catión y tan sólo un oxígeno terminal se orienta hacia fuera del plano. En el caso del complejo PEG9-K<sup>+</sup>, en el que un máximo de 10 oxígenos pueden coordinar con el catión, el conformero de menor energía corresponde a estructuras de tipo “jaula”, en las que 8 oxígenos coordinan con el catión a la vez que se establecen puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales. El cálculo B3LYP predice que el aumento del número de coordinación supone un incremento de la energía del complejo, a causa del aumento de las distancias oxígeno-catión asociadas a los efectos estéricos de las repulsiones oxígeno-oxígeno que implica este número de coordinación. La coordinación de 10 oxígenos que muestran conformeros con estructura

helicoidal del polímero en torno al catión, en la que se establecen puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales y los oxígenos del esqueleto del poliéter, son aún más energéticas.

\* Del análisis conformacional comparativo de los complejos binario (15c5-K<sup>+</sup>) y ternario (15c5-K<sup>+</sup>-15c5) del 15c5 con el catión K<sup>+</sup> pueden extraerse varias conclusiones. En primer lugar, la coordinación oxígeno-catión es más estrecha en el caso del complejo binario que en el ternario, siendo las interacciones atractivas más fuertes en el primer caso. Como consecuencia, la banda asociada al C-O en el complejo ternario aparece desplazada en los espectros hacia números de onda más bajos. En segundo lugar, la exposición del catión en el complejo binario, que se sitúa por encima del ciclo, permite la formación del complejo ternario de forma eficiente. En este caso, la interacción con el catión es más débil, pero la estructura de los dos éteres-corona que forman parte del complejo continúa experimentando una distorsión significativa. Por último, el complejo ternario adopta una configuración de tipo *sandwich* en la que los dos éteres-corona minimizan las interacciones repulsivas entre los pares solitarios de los oxígenos de sus respectivos esqueletos moleculares, mediante la rotación de los mismos, uno con respecto a otro, quedando los oxígenos de uno y otro lado intercalados. Este tipo de sistemas ternarios podrían tenerse en cuenta en el diseño de pinzas moleculares basadas en éteres-corona, los cuales son sistemas lo suficientemente flexibles como para adoptar estructuras de equilibrio mediante la rotación relativa de las cavidades, y albergar potencialmente a distintos ligandos.

---

\* Los resultados obtenidos del análisis de los complejos formados por los éteres-corona 18c6 y 15c5 con los cationes moleculares H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en fase gaseosa, han proporcionado una nueva visión acerca del papel del protón como intermediario para la estabilización de este tipo de complejos.

\* En el caso de los complejos formados por el poliéter 18c6 con H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, los resultados confirman la adopción de una estructura abierta por parte del éter, de simetría C<sub>3v</sub>, acorde con la coordinación del éter-corona con ambos huéspedes mediante tres puentes de hidrógeno lineales. En cambio, en los complejos del 15c5, el anillo del éter adopta conformaciones parcialmente plegadas que dan lugar a estructuras asimétricas con geometría piramidal, al coordinarse con el catión. Como principal característica, estos complejos muestran un puente de hidrógeno lineal más corto y dos de mayor longitud, en contraposición a lo observado en el caso del 18c6. La coordinación O-H<sup>+</sup>...O(éter) y N-H<sup>+</sup>...O(éter) muestra distancias interatómicas típicas de puentes de hidrógeno de fuerza intermedia. La compartición de protones es despreciable en los complejos 15c5-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 18c6-H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y 18c6-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, todos los cuales muestran bandas IRMPD bien definidas, en buen acuerdo con las predicciones B3LYP.

\* Por el contrario, el complejo 15c5-H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> presenta distancias más cortas entre el éter y el catión, lo que genera puentes de hidrógeno más fuertes. Los espectros IRMPD de los complejos 15c5-H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y 15c5-D<sub>3</sub>O<sup>+</sup> se diferencian de los anteriores por cambios sustanciales en las intensidades, anchura, y en general, en la forma de las bandas vibracionales. Estos rasgos espectrales pueden interpretarse como resultado de la deslocalización parcial del protón a lo largo del puente de hidrógeno lineal. Como consideración general, estos resultados muestran que la sensibilidad de la espectroscopia IRMPD a la no armonicidad y los efectos de acoplamiento vibracional, es útil para analizar los efectos de la deslocalización protónica en complejos supramoleculares de similares características.

---

\* La conformación más estable del complejo 18c6H<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, formado por un éter-corona con cuatro brazos carboxílicos de naturaleza quiral, con el catión amonio, corresponde a una estructura del éter de tipo “barril” (con simetría C<sub>2</sub>) con una disposición del anillo del éter prácticamente plana, que coincide esencialmente con la estructura determinada mediante métodos cristalográficos en estudios previos. Tal disposición implica una coordinación tetrapodal del catión NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con dos grupos C=O de los brazos carboxílicos enfrentados, y con cuatro oxígenos del anillo del éter en una disposición parcialmente bifur-

cada. En términos energéticos, el siguiente conformero obtenido del estudio teórico es el asociado a una estructura tipo “cuenco”, caracterizada por la existencia de un puente de hidrógeno entre dos grupos carboxilo de lados opuestos del anillo. El catión  $\text{NH}_4^+$  también muestra una coordinación tetrapodal con el éter-corona, en este caso con tres oxígenos del anillo del poliéter y con uno del grupo  $\text{C}=\text{O}$  de uno de los brazos.

\* La contribución conjunta de los espectros de infrarrojo resultantes del cálculo B3LYP/6-311++G (2d,2p) para los dos conformeros descritos muestra un excelente acuerdo con el espectro medido experimentalmente con la técnica IRMPD. Puede concluirse por tanto que este par de conformeros domina realmente el abanico conformacional del complejo  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  en fase gaseosa a temperatura ambiente. Y también que las estructuras tipo “barril” y tipo “cuenco” son óptimas para el enlace multipodal con aminas protonadas. De hecho, es notable la similitud encontrada entre las características conformacionales del complejo  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  en fase gaseosa y las descritas en estudios previos de cristalografía de rayos x y de espectroscopia de resonancia magnética nuclear.





## Parte I

# Agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI-TOF



# CAPÍTULO 1

---

## Introducción

---



## 1.1. Motivación y objetivos generales del bloque

La desorción/ablación láser acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo es una técnica ampliamente utilizada para caracterizar un gran abanico de compuestos de diversa naturaleza. Las condiciones que rigen los procesos de desorción/ionización láser determinan la existencia de fenómenos de fragmentación, agregación y/o polimerización de las especies desorbidas.

Los capítulos siguientes abordan la caracterización de dos sistemas moleculares modelo: compuestos s-triazínicos (cap. 3) e hidrocarburos poliaromáticos (cap. 4), centrándonos en el análisis de las interacciones supramoleculares que se producen en nuestras condiciones experimentales y que resultan en la formación de agregados de naturaleza covalente y no covalente de las especies de partida y sus fragmentos. Como aplicación de lo aprendido con los sistemas modelo, intentaremos contribuir a la resolución del problema de la caracterización molecular de los asfaltenos (cap. 4, 5 y 6), compuestos hidrocarbonados de gran complejidad, procedentes de la fracción más pesada del petróleo y el carbón.

Al inicio de cada uno de los capítulos se incluye un breve resumen de los objetivos, resultados y principales conclusiones obtenidas en cada caso, para ofrecer una panorámica de los contenidos que aportará el capítulo a la línea argumental de este bloque.

La combinación de técnicas de desorción/ionización láser (LDI y MALDI) aplicada al estudio de estos fenómenos de agregación supramolecular contribuirá a dilucidar las interacciones responsables de la agregación y en qué momento del proceso se generan los *clusters* detectados, así como la influencia del modo de extracción de iones del equipo y el método de preparación de muestras utilizado en dichas interacciones supramoleculares. A partir del análisis de los fenómenos de agregación se extraerán conclusiones relevantes sobre su relación con la estructura y composición de las moléculas de partida; información que puede ser relevante para la comprensión de los procesos de agregación que tienen lugar en sistemas de mayor complejidad y en fases condensadas.

A continuación se realizará una descripción de los fundamentos de las técnicas de desorción/ionización láser empleadas en este trabajo, prestando especial atención a los mecanismos responsables de la desorción e ionización de las especies analizadas.

## 1.2. Desorción/ionización láser

De forma general podemos definir la desorción/ionización láser (LDI, del inglés *Laser Desorption Ionization*) como el proceso por el cual se induce la desorción e ionización de las especies presentes en una muestra, normalmente sólida, mediante la irradiación con luz láser de un área pequeña de la misma. Las especies generadas de este modo se analizan habitualmente mediante espectrometría de masas o espectroscopía de emisión.

Los láseres empleados en experimentos de desorción son en general pulsados, con anchuras temporales de unos pocos nanosegundos y frecuencias de repetición de hasta 1 kHz. El haz suele focalizarse en un área muy pequeña de la muestra, del orden de decenas de  $\mu\text{m}$ , con lo que la densidad de radiación por unidad de área puede llegar a ser muy alta. Cualquier sustancia situada en el área de incidencia del láser y capaz de absorber la radiación de longitud de onda emitida verá incrementada su energía interna rápidamente. Si la disipación del exceso de energía en forma de calor es suficientemente lenta, la sustancia se vaporiza provocando que las moléculas sean desorbidas y abandonen el área de irradiación. Si la excitación que alcanzan las moléculas es lo suficientemente grande, éstas pueden perder electrones dando lugar a iones, bien como consecuencia de la absorción de la radiación láser, bien en diversos procesos de transferencia de carga durante el proceso de desorción. El panel superior de la figura 1.1 muestra de forma esquemática el proceso LDI y pone de manifiesto la variante al mismo que incorpora la técnica MALDI (panel inferior de la misma figura), cuyos fundamentos se describirán más adelante en esta sección.

En general, la capacidad del láser para desorber e ionizar una sustancia depende de la potencia láser empleada y del solapamiento entre la longitud de onda de la luz láser y el espectro de absorción de la sustancia irradiada. En este contexto, es

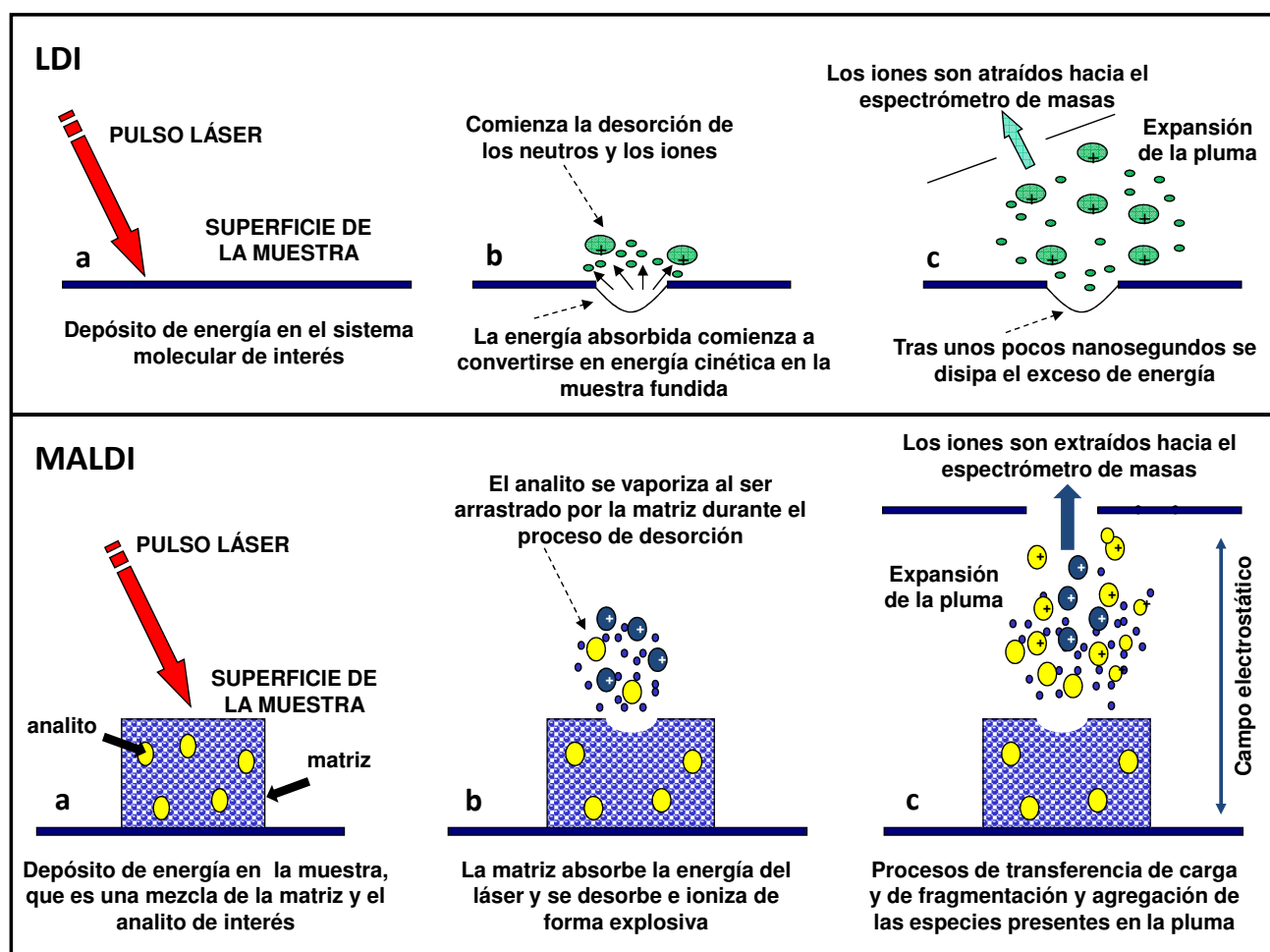


Figura 1.1: **Ilustración del proceso de desorción/ionización láser.** El pulso láser alcanza la superficie de la muestra (a), depositando energía que será absorbida por el sistema molecular de interés (LDI, panel superior) o bien por la matriz (MALDI, panel inferior), provocando la fusión y vaporización (desorción) de las moléculas diana (b), y en el caso de MALDI, el arrastre de las moléculas de analito. En la pluma tienen lugar procesos de transferencia de carga y fenómenos de fragmentación y agregación (c), generándose una serie de iones que son acelerados y extraídos hacia el espectrómetro de masas.

interesante señalar que si bien los espectros LDI obtenidos empleando radiación láser ultravioleta e infrarroja son similares, obviamente el mecanismo primario por el cual se induce la desorción es muy distinto en los dos casos, debiéndose en el caso de la desorción ultravioleta a la excitación electrónica del analito de interés o de la matriz, y en el caso de la desorción infrarroja a la excitación resonante de vibraciones moleculares. En este sentido, la desorción infrarroja presenta un carácter más universal, ya que permite obtener iones de un amplio abanico de sustancias de forma directa, sin necesidad de añadir a las muestras compuestos cromóforos que modulen su vaporización e ionización, como ocurre

en MALDI.

La técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, del inglés *Matrix-assisted laser desorption ionization*) es una variante de la técnica LDI en la que la diferencia principal radica en el empleo de una sustancia a la que se denomina “matriz”, y que mezclada con el analito de interés es la responsable de la absorción de la radiación emitida por el láser, permitiendo la desorción e ionización del analito de forma intacta. Para llevar a cabo el análisis de sustancias mediante la técnica MALDI, estas se mezclan con el compuesto matriz en proporciones variables de manera que queden

muy diluidas en su seno. Idealmente en un experimento de este tipo la absorción de la radiación láser por parte del analito debe de ser nula o muy pequeña en comparación con la del compuesto que actúe como matriz. Así, al interaccionar la muestra con el pulso láser es la matriz la que experimenta un incremento notable de su energía interna, produciéndose la desorción e ionización rápida de la misma en los términos descritos anteriormente. En este caso, el analito será literalmente arrastrado por la matriz durante el proceso de desorción, vaporizándose e ionizándose de forma “suave”, es decir, con un reducido grado de fragmentación. El panel inferior de la figura 1.1 ofrece una visión esquemática del proceso MALDI, que puede compararse con el proceso LDI, esquematizado en el panel superior de la misma figura.

Desde un punto de vista práctico el éxito en la realización de un experimento MALDI pasa por dos pasos críticos: la elección de la matriz y la del método de preparación de la muestra [1]. Ambos aspectos influyen en el proceso de ionización del analito, la formación de aductos, la estabilidad o fragmentación de las moléculas estudiadas y en la sensibilidad del experimento.

De forma general los requisitos que debe reunir una sustancia para actuar como matriz en el proceso son:

1. Poseer propiedades de solubilidad similares a las del analito para incorporarlo de forma eficiente por cocrystalización desde un mismo disolvente, o bien, mezclarse con las sustancias objeto de análisis de forma homogénea en fase sólida.
2. Absorber la energía emitida por el láser de forma eficiente (vía excitación electrónica en el caso de análisis UV-MALDI o vibracional en análisis IR-MALDI).
3. Redistribuir la energía absorbida de forma rápida para promover su desorción “explosiva” y arrastrar al analito durante el proceso.
4. Ceder protones o dotar de carga al analito permitiendo su ionización de forma eficiente.

Son numerosas las sustancias que han sido utilizadas como matrices MALDI para distintas apli-

caciones desde que se desarrolló la técnica a finales de los 80. Con la excepción del requerimiento de que la matriz tiene que absorber la radiación láser, no existen reglas generales que sirvan para predecir la conveniencia de emplear una sustancia u otra como matriz basándose en sus propiedades físico-químicas. En la mayoría de los casos, la búsqueda de nuevas matrices es un proceso básicamente empírico en el que se tienen en cuenta una serie de reglas prácticas, como son en los métodos tradicionales, que la matriz y el analito sean solubles en disolventes compatibles, que la absorción por parte de la matriz a la longitud de onda de emisión del láser sea buena, que la matriz sea inerte y además que tenga una alta estabilidad en el vacío. A la hora de analizar compuestos de bajo peso molecular, también debe tenerse en cuenta el solapamiento que puede producirse entre la señal correspondiente a los fragmentos de la matriz y la señal de los analitos de interés.

En general las matrices son compuestos de carácter ácido capaces de dotar de carga al analito (en muchos casos mediante la cesión de protones) permitiendo su ionización “suave” y su detección en el espectrómetro de masas. Es el caso de los derivados del ácido benzoico [2] del ácido cinámico [3], el ácido ferúlico y el ácido sinapínico (para el análisis de péptidos, proteínas y glicoproteínas) y compuestos aromáticos con contenido en heteroátomos, especialmente los derivados de la piridina, la 3-aminoquinolina, y el ácido picolínico (para la detección de oligonucleótidos o sustancias lábiles de carácter ácido, así como cuando haya que evitar la fragmentación metaestable del analito [4]). Evidentemente, hay un amplio abanico de otras sustancias que se utilizan como matrices, como son las poli-hidroxi-acetofenonas, las porfirinas y los fulerenos.

En todos los casos, un aspecto importante es la proporción molar matriz/analito. Para preparar las muestras que posteriormente serán analizadas mediante la técnica MALDI habrá que mezclar el compuesto matriz con el analito de interés en distintas proporciones molares. Dicha relación es altamente variable y depende del método de preparación de muestras que se esté utilizando y de la naturaleza del analito y la matriz, por lo que su determinación tiene un marcado carácter empírico. Para analizar compuestos de alto peso mole-

cular (como péptidos, proteínas o polinucleótidos) los mejores resultados se obtienen con proporciones variables matriz:analito que oscilan entre 1.000:1 y 100.000:1. Sin embargo, para moléculas de menor peso molecular (de relación  $m/z < 700$  uma) la proporción oscila en un intervalo menor, entre 10:1 y 1000:1 [3].

En cuanto a los tipos de láseres empleados para desorber e ionizar las muestras en MALDI, el láser de nitrógeno (que emite radiación de 337 nm) es el que tradicionalmente se acoplaba a equipos comerciales, si bien en la actualidad también son frecuentes los equipos con láseres de Nd:YAG incorporados (en los que se emplean preferentemente su tercer y cuarto armónicos, 355 y 266 nm, respectivamente). La realización de experimentos MALDI empleando radiación láser infrarroja suele llevarse a cabo en equipos de fabricación propia utilizando láseres de emisión en el infrarrojo, como pueden ser los de Er:YAG, CO<sub>2</sub>, osciladores ópticos paramétricos, etc.

### 1.3. Mecanismos de desorción e ionización láser

La interacción de la radiación láser con materiales de diversa naturaleza es un fenómeno tremendamente complejo. En función de la intensidad del haz de luz láser podemos definir distintos regímenes de interacción. Cuando se emplean pulsos láser de muy baja energía<sup>1</sup> se produce la simple desorción del material. Al aplicar energías moderadas tienen lugar fenómenos de desorción y de ionización<sup>2</sup> y al incrementar aún más la energía<sup>3</sup> se producen fenómenos de ablación del material irradiado.

Debido a la complejidad del fenómeno y a las

<sup>1</sup>En nuestro caso y al emplear radiación láser ultravioleta de 280 nm, pulsos láser de muy baja energía serían por ejemplo los inferiores a  $5\mu\text{J}$  (lo que equivale a fluencias del orden de  $15\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) y al emplear radiación láser infrarroja de  $3,45\mu\text{m}$  serían los de entre 1 y 3mJ de energía (que equivalen a fluencias del orden de  $10\text{--}30\text{J}/\text{cm}^2$ )

<sup>2</sup>En nuestro caso y al emplear radiación láser ultravioleta de entre 266 y 355 nm serían pulsos de energía media aquellos con energías en el intervalo de  $5\text{--}50\mu\text{J}$ , dependiendo de la muestra

<sup>3</sup>En nuestro caso energías por pulso láser ultravioleta superiores a  $30\text{--}50\mu\text{J}$ , y en general energías del orden de mJ

características de cada muestra es difícil determinar con exactitud los umbrales de intensidad de radiación láser que delimitarían cada uno de los regímenes, ya que empíricamente sería posible establecer umbrales de detección que no son los umbrales físicos, por lo que en muchos casos conviven fenómenos de desorción/ionización con fenómenos de ablación en experimentos llevados a cabo a intensidades láser bajas y moderadas.

En el caso de la técnica MALDI, y a pesar de haber transcurrido más de dos décadas desde su nacimiento, aún no existe un consenso en cuanto a los mecanismos implicados en los procesos de desorción/ionización que tienen lugar. La dificultad de proponer un modelo general radica en la complejidad del proceso, en el que concurren múltiples factores. Además, las nuevas posibilidades que se plantean con la incorporación de metodologías novedosas de preparación de muestras, ponen de manifiesto la existencia de mecanismos de desorción e ionización alternativos a los considerados tradicionalmente.

Sirva de ejemplo que ya en los primeros años de desarrollo de la técnica, cuando las muestras se preparaban de forma rutinaria mediante el método de coprecipitación (*air dried-droplet*), existían teorías contrapuestas acerca de los fenómenos de transferencia de carga que tenían lugar durante el proceso MALDI, defendiendo unos que tales fenómenos se producían principalmente en fase gaseosa, tras la transición de la muestra desde el estado sólido, mientras que otros postulaban la formación de *clusters* o agregados de matriz-analito que adquirirían carga antes de abandonar la superficie de la muestra [5].

El éxito del método de preparación de muestras libres de disolvente (*solvent-free*) [6] supuso una revisión de muchos de los conceptos aparentemente consolidados en los años de vida de la técnica [7]. Es el caso por ejemplo de la preorganización del analito y la matriz (cocrystalización) previa a la desorción, considerada requisito para el éxito de los análisis MALDI hasta los últimos años del siglo XX. Con los numerosos estudios *solvent-free* realizados se demuestra que tan solo se requiere la desorción conjunta de las moléculas de matriz y analito para que el proceso MALDI sea efectivo. Es más, parece que la formación de la estructura ma-



crocrystalina dificulta la desorción e ionización del analito, ya que frecuentemente es necesario aplicar energías láser mayores para analizar muestras preparadas de este modo [8]. De igual manera, la desorción directa de analitos ya cargados parece perder fuerza como proceso dominante debido a que tanto la ionización del analito como las interacciones supramoleculares parecen tener lugar principalmente en la fuente de iones durante el proceso de desorción.

### 1.3.1. El proceso de desorción

**Ablación y desorción láser.** En este punto abordaremos la descripción de los procesos de desorción y ablación láser, así como de los dos regímenes de confinamiento (térmico y por estrés termoeelástico) que pueden tener lugar en el material irradiado en cada caso. También se expondrán las principales conclusiones de estudios teóricos de dinámica molecular de diversos autores [9, 10] que simulan cómo se manifiestan tales procesos en el material irradiado, y se discutirán los mecanismos implicados en el proceso de desorción/ablación láser de materiales.

El proceso que tiene lugar cuando se realizan experimentos LDI empleando pulsos láser de muy baja intensidad ( $\leq 10^7 \text{ W/cm}^2$ ) y de forma general en los experimentos MALDI, es fundamentalmente un proceso de naturaleza térmica, en el cual la transferencia de moléculas individuales desde la fase condensada al estado gaseoso ocurre desde las capas más superficiales de la muestra. Al irradiar con luz láser de baja energía se produce un aumento de la temperatura de la capa más superficial de la muestra, que tiene como consecuencia en primera instancia, la eyección de moléculas que pasan a estado gaseoso. Conforme la temperatura en la superficie del material se aproxima al punto de fusión, siguen pasando moléculas a la fase gaseosa directamente desde el estado sólido. Sin embargo, al incrementar la energía de irradiación, llega un momento en que la superficie de la muestra que interacciona con el láser empieza a fundirse, y la desorción se produce desde la fase fundida.

Cuando la intensidad del pulso láser sobrepasa cierto umbral deja de producirse la desorción de una simple monocapa de moléculas, produciéndose

la ablación del material, proceso que deja de tener naturaleza puramente térmica y que da como resultado la eyección de especies atómicas, moleculares, agregados e incluso cantidades macroscópicas del material si las energías que se aplican son muy altas.

Tanto la fluencia láser (cantidad de energía por unidad de área) que da lugar a los procesos de desorción/ablación del material irradiado, como los mecanismos que subyacen a dichos procesos, dependen de los parámetros del haz láser y también de las características del material. Al emplear radiación láser de intensidad moderada ( $\leq 10^9 \text{ W/cm}^2$ ) el arranque de material desde la superficie de la muestra puede producirse mediante procesos de naturaleza térmica o mecánica dependiendo de la competencia entre la velocidad con que se deposita la energía del láser en el material y el tiempo necesario para la relajación térmica del mismo [11]. De este modo, en materiales con alta conductividad térmica la energía se disipa rápidamente convirtiéndose en energía térmica, produciéndose la vaporización del material y predominando un régimen de ablación térmica. En el caso opuesto, cuando la relajación térmica del material es lenta respecto a la velocidad con que se deposita la energía del láser, tiene lugar la ruptura fotoquímica de enlaces, y el proceso de ablación deja de tener naturaleza térmica. Cada uno de los mecanismos produce efectos específicos en la superficie de la muestra y en la composición y distribuciones de velocidades de las especies eyectadas, como se discutirá más adelante, al describir específicamente las características de la nube densa de material eyectado que se genera durante el proceso LDI.

Diversos autores [9, 10, 12, 13] proponen expresiones que relacionan los tiempos característicos de difusión térmica y relajación mecánica de los materiales irradiados con la duración del pulso láser, y que permiten establecer la naturaleza térmica o mecánica del proceso de ablación:

$$\tau_{th} \approx L_p^2/D_T$$

$$\tau_s \approx L_p^2/\nu_T$$

donde  $\tau_{th}$  y  $\tau_s$  hacen referencia al tiempo de difusión calorífica y de relajación mecánica del material, respectivamente, siendo  $L_p$  la profundidad

de penetración del haz láser en el material,  $D_T$  la difusividad térmica del material y  $\nu_T$  la velocidad del sonido en el material.

Existen simulaciones de dinámica molecular realizadas por Zhigilei y colaboradores [9, 10] orientadas a identificar los procesos que distinguen la desorción de la ablación y a determinar los valores umbrales de fluencia que separan ambos tipos de regímenes. En tales estudios también se investiga la dependencia de los procesos de eyección de material de las condiciones de irradiación, como son la fluencia, la duración del pulso láser y la penetración óptica. A partir de tales simulaciones los autores predicen la composición de la pluma en función de las condiciones de irradiancia y proponen cuáles son las bases físicas que explican las distribuciones de velocidades de las especies presentes en la pluma, y la influencia de la masa de las partículas en tales distribuciones. Todo ello comparando los resultados y predicciones teóricas con datos experimentales.

A continuación, expondremos las principales conclusiones acerca de la identificación de los procesos que distinguen la desorción y la ablación, así como la determinación de la fluencia umbral entre ambos tipos de regímenes.

Cuando la duración del pulso láser es inferior al valor de  $\tau_{th}$  el calor generado por la absorción de la radiación permanece confinado en el volumen irradiado, no pudiendo disiparse mediante fenómenos de conducción. En este caso el proceso de interacción láser-material transcurre en condiciones de “confinamiento térmico”, en las que la disipación del calor y el daño provocado en superficies adyacentes al área irradiada por el haz láser son limitados. Este régimen es el característico de los análisis UV-MALDI.

En los estudios teóricos de dinámica molecular de Zhigilei [9, 10] los autores comparan los efectos que se producen al irradiar su sistema con pulsos láser de 150 y 15 ps. En el caso del sistema utilizado en la simulación, el pulso de 150 ps es de menor duración que el tiempo de difusión térmica del material a lo largo del perfil de absorción:  $\tau_{th} \approx 10$  ns; pero mayor que el tiempo necesario para alcanzar condiciones de equilibrio desde el punto de vista mecánico en el volumen de material

que absorbe la radiación láser:  $\tau_s \approx 20$  ps. Por tanto, consideran que las simulaciones realizadas empleando pulsos láser de 150 ps reflejan condiciones de “confinamiento térmico” pero no de “confinamiento por estrés termoelástico”. Y tales condiciones serían comparables a las que se producen en los experimentos UV-MALDI. En concreto existen estimaciones temporales para la relajación térmica del material en experimentos UV-MALDI típicos que proporcionan valores en torno a los 10 ns [14], tiempo superior al de los pulsos empleados normalmente en análisis MALDI que suelen ser de unos pocos nanosegundos. Estudios de Dreisewerd y colaboradores [15] han demostrado que en estas condiciones las características del proceso de desorción/ablación están determinadas por la cantidad de energía depositada por el pulso láser más que por la duración del pulso en cuestión, conclusiones corroboradas por estudios previos de Riahi y colaboradores [16].

La interacción del láser con el material también puede producirse en régimen de “confinamiento por estrés mecánico”, cuando la duración del pulso láser es menor que el valor de  $\tau_s$ . En este caso tiene lugar un calentamiento en condiciones isométricas (volumen constante) que genera una onda termoelástica que se propaga por el material, y que provoca en la interfaz aire-material fenómenos de compresión-tensión que pueden promover el arranque de material mediante la ruptura mecánica de las capas superiores de la superficie irradiada. En el caso de los estudios de Zhigilei y colaboradores [9, 10] tales condiciones serían las que primarían en las simulaciones realizadas con pulsos láser de 15 ps de duración, tiempo inferior a  $\tau_s$ .

Es importante señalar que aun cuando se emplee el término “desorción” al referirnos a la técnica MALDI, al trabajar con pulsos láser del orden de nanosegundos el mecanismo que subyace es esencialmente un proceso de ablación térmica de la muestra [12]. No obstante, el término “desorción” es el que se utiliza de forma genérica en la bibliografía para definir el arranque de material que tiene lugar en MALDI [12] y es el que emplearemos también en esta memoria.

Los estudios mencionados previamente acerca de los procesos que experimenta el material irradiado en condiciones de confinamiento térmico y

por estrés termoelástico en función de la fluencia láser concluyen que ambos tipos de regímenes resultan en procesos de eyección de material claramente diferenciados por una fluencia umbral, que delimitaría los procesos de desorción de los de ablación. Cuando se simula qué ocurre con el sistema irradiado en condiciones de confinamiento por estrés termoelástico se observa la aparición de burbujas bajo la superficie del material que aumentan de tamaño con el tiempo y que producen finalmente la ruptura del mismo y la eyección de grandes fragmentos. En cambio, al aplicar fluencias por debajo del umbral de ablación, el arranque de material se produce en condiciones de confinamiento térmico. En este caso no se forman burbujas fruto del calentamiento heterogéneo del material, sino que se observa una fase intermedia de aspecto espumoso desde la cual emergen gotas individuales a la fase gaseosa.

Finalmente, cuando se simula el mecanismo de eyección del material en condiciones de muy baja fluencia láser tiene lugar un proceso “explosivo” que resulta en la descomposición de la superficie irradiada en una mezcla de moléculas individuales y pequeños *clusters* que conformará la pluma de desorción, independientemente del régimen de confinamiento que tenga lugar y de la duración del pulso láser.

**La pluma de desorción.** La nube de material eyectado en los procesos de desorción/ablación se denomina “pluma”. Al estudiar los fenómenos de agregación que experimentan los compuestos de interés en los experimentos LDI/ MALDI es necesario contemplar los parámetros que caracterizan la pluma de desorción, como son su composición, evolución temporal, distribución de velocidades y energía interna de sus componentes.

Los principales componentes de la pluma son moléculas neutras, iones, *clusters* y fragmentos, siendo las especies neutras las predominantes en todos los casos [9–12]. Durante el proceso de expansión de la pluma tienen lugar múltiples procesos que ocurren en diferentes escalas temporales, como son las colisiones entre componentes, la evaporación y crecimiento de *clusters* por condensación, ionización, neutralización y otras reacciones químicas y la extracción de partículas cargadas por campos

externos.

**Modelos de transición de fase.** Existen expresiones que relacionan el número de moléculas eyectadas con la fluencia láser aplicada, de forma que cuanto mayor sea la intensidad del láser, mayor será la cantidad de material eyectado a la fase gaseosa. En concreto, durante el proceso de desorción (procesos de evaporación/sublimación), el ritmo de eyección del material puede relacionarse con la temperatura mediante una dependencia exponencial en términos de la ecuación de Arrhenius [12] (expresada en su forma física, en la que la constante de Boltzman multiplica a la temperatura en lugar de la constante de los gases):

$$N = A \exp \left[ -\frac{E_s^*}{k_B (T_0 + BF)} \right], \quad F \leq F_{th} \quad (1.1)$$

siendo  $F$  la fluencia láser,  $F_{th}$  la fluencia láser umbral que delimita los fenómenos de desorción y ablación,  $N$  el número de moléculas desorbidas durante la simulación,  $E_s^*$  la energía de activación,  $A$  un factor que corrige el valor de la temperatura al introducir los efectos de la variación de entropía del sistema,  $B$  un factor que describe la conversión de la energía depositada en un incremento de la temperatura de la superficie,  $T_0$  la temperatura inicial del material y  $k_B$  la constante de Boltzmann.

Estudios realizados por Von Allmen [17] también concluyen que para pulsos láser cortos, del orden de nanosegundos y menor duración, y procesos de vaporización de naturaleza térmica del material, la cantidad de moléculas eyectadas es proporcional a la temperatura.

Para procesos de ablación, en los que la fluencia láser es superior a la fluencia umbral, la cantidad de material eyectado se ajusta mejor a un modelo distinto al anterior que contempla el hecho de que todo el material que absorbe una densidad de energía superior a un valor crítico es ablacionado (fotoablación):

$$N = n_m L_p \ln \left[ -\frac{F}{L_p (E_v^* - CT_0)} \right], \quad F \geq F_{th} \quad (1.2)$$

donde  $n_m$  es la densidad molecular del material,  $L_p$  es la profundidad de penetración del láser,  $C$  es el calor específico del material, y  $CT_0$  es la densidad de energía térmica del material previa a la irradiación con el láser. Esta expresión predice la existencia de una fluencia umbral  $F_{th} = L_p (E_v^* - CT_0)$  a la cual la densidad de energía crítica  $E_v^*$  es alcanzada por la superficie irradiada.

Es importante señalar que estos modelos, aunque se ajustan a los resultados experimentales razonablemente bien [14], poseen sus limitaciones.

Mientras que la transición a la fase gaseosa del material vía sublimación/vaporización da lugar a la eyección de moléculas individuales de forma predominante, así como a pequeños *clusters*, la ablación de material a través de procesos “explosivos” genera *clusters* de mayor tamaño e incluso fragmentos de material [12, 18].

**Composición de la pluma. Distribución espacial de componentes.** Estudios de dinámica molecular realizados por diversos autores [9, 10, 19, 20] describen el proceso de formación de la pluma de desorción y las principales características de la misma, poniendo de manifiesto que las distintas zonas de la pluma presentan diferencias en cuanto a su densidad y composición. Suponiendo condiciones de ablación directa en régimen de confinamiento térmico, el material irradiado se va calentando y fundiendo, superando la temperatura de vaporización ( $\approx$  cientos de ps). La temperatura seguirá aumentando dando lugar a la formación de burbujas en la zona irradiada, constituida en este momento por regiones líquidas interconectadas y vapor ( $\approx 1$  ns), lo que facilita la ebullición explosiva de la misma [19, 20] y su descomposición en gotas líquidas, moléculas en fase gaseosa y *clusters* pequeños.

Teniendo en cuenta que la temperatura del material no es la misma a distintas profundidades durante el pulso láser, todas las zonas del material no experimentan los mismos procesos, y la pluma que se genera poseerá diferente densidad y composición. El frente de la pluma estará constituido por el material eyectado desde las capas superiores de la muestra, esto es, moléculas en fase gaseosa seguidas de pequeños *clusters* que se generan rá-

pidamente tras la incidencia del pulso láser (100 ps). La región intermedia la ocuparán *clusters* de tamaño medio procedentes de la desintegración explosiva de capas más profundas del material (1 ns), y la región adyacente a la superficie irradiada estará dominada por la presencia de *clusters* grandes o muy grandes.

**Dinámica de la pluma. Distribución de velocidades de sus componentes.** En las dos últimas décadas se han realizado varios estudios sobre la velocidad a la que se desplazan los distintos componentes de la pluma de desorción: iones, moléculas neutras y *clusters* [12, 21–25].

Las velocidades de los componentes de la pluma pueden deducirse a partir del tiempo de vuelo en la región libre de campo cuando no se aplica ningún retraso entre la generación y la extracción de iones en la fuente del espectrómetro de masas. En el caso de que se trabaje con fuentes pulsadas las velocidades axiales se deducen a partir del cambio en el tiempo de vuelo total de las especies al variar el retraso aplicado entre el disparo del láser y la extracción de iones.

Las velocidades axiales estimadas de los iones varían desde unos cientos de  $\text{ms}^{-1}$  cuando se opera en condiciones de extracción retardada de iones hasta valores del orden de  $1000 \text{ ms}^{-1}$  en experimentos con extracción libre de campo [12]. Esta disparidad de valores responde a la diversa naturaleza química de los analitos y al tipo de ionización que experimentan en el proceso LDI/MALDI, y también a las características de la matriz empleada en el caso de los experimentos MALDI. No existe consenso en la influencia de la fluencia láser sobre la velocidad axial de los iones presentes en la pluma de desorción. Mientras que autores como Gluckmann y colaboradores [26] proponen que ambos parámetros son independientes, otros como Spengler y Bökelmann [27] postulan la existencia de una relación casi lineal entre la fluencia aplicada y la velocidad de los iones.

En el caso de los *clusters* se produce una segregación espacial de los mismos en la pluma en función de su tamaño como consecuencia de su generación a partir de procesos diferentes, tal y como se ha descrito más arriba. Los agregados de mayor

tamaño tienden a ser más lentos y por ello se localizan más próximos a la superficie irradiada. Los *clusters* mayores también poseen energías internas más altas y temperaturas mayores que los más pequeños, ya que estos últimos, que ocupan el frente de la pluma, proceden de un proceso explosivo que les empuja a experimentar una rápida expansión que favorece su enfriamiento. Los *clusters* de diferentes tamaños se mueven a lo largo de la pluma con las moléculas individuales de material, con velocidades parecidas.

Aunque tanto los iones como las especies neutras de la pluma proceden del mismo proceso, en general las velocidades iniciales estimadas para los neutros son menores que la de los iones. Puzos y Geohegan han realizado varios estudios [28, 29] que ponen de manifiesto la presencia de iones preferentemente en el frente de la pluma de desorción. Otros autores como Huth-Fehre y colaboradores [30, 31], utilizando métodos de pos-ionización de especies neutras en la pluma, concluyen que en el caso de análisis MALDI, analitos y matrices presentan velocidades similares. Diversos estudios sobre la expansión de neutros en la pluma proponen que dicha expansión es consistente con distribuciones de Maxwell-Boltzmann [30–33] o con funciones de Maxwell-Boltzmann modificadas introduciendo parámetros que tienen en cuenta las propiedades de expansión de varios sistemas contemplados en la literatura [23, 34, 35]. Estudios de Tsai y colaboradores [25] concluyen que en la expansión de la pluma pueden encontrarse hasta tres componentes, una de las cuales es la más rápida y se asocia con la desorción explosiva de la superficie del material, y otras dos componentes más lentas, relacionadas con la desorción térmica del material situado en capas más profundas.

### 1.3.2. Ionización en experimentos LDI/MALDI

Se denomina ionización al proceso mediante el cual un átomo o molécula se transforma en un ion a través de la pérdida o adición de partículas cargadas, como los electrones, o de otros iones. Los mecanismos de ionización presentes en los experimentos LDI/MALDI se resumen a continuación:

a) **pérdida de electrones.** Es un método de

ionización en el que se produce un ion de carga positiva mediante la pérdida de uno o varios electrones del átomo o molécula de interés a causa de la absorción de la energía necesaria para superar la barrera de potencial eléctrico que los mantenía confinados. Tal cantidad de energía se denomina energía de ionización. En este contexto se define el umbral de ionización como la energía límite a partir de la cual se produce la ionización del sistema.

b) **protonación.** Es un método de ionización mediante el cual un protón es transferido a la molécula de analito, produciendo una carga positiva por cada protón añadido. Las cargas positivas tienden a interactuar con los residuos de carácter más básico de las moléculas, como las aminas por ejemplo, para formar cationes estables.

c) **desprotonación.** En este caso la carga neta negativa se alcanza a través de la eliminación de un protón de una molécula. Este mecanismo de ionización es muy útil para la ionización de las especies de carácter más ácido.

d) **cationización.** Es un método de ionización que produce un complejo cargado mediante la adición no covalente de un ion de carga positiva a una molécula neutra. El enlace del catión a una molécula, a diferencia de lo que ocurre con los protones, es de naturaleza menos covalente, y la carga permanece localizada en el catión. Esto minimiza la deslocalización de la carga y la fragmentación de la molécula. Los carbohidratos son excelentes candidatos para este mecanismo, así como ciertos polímeros del tipo polietilenglicol.

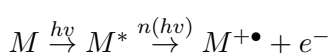
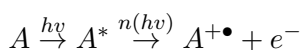
e) **neutralización de cargas.** La neutralización es un proceso dominante en la pluma en los experimentos MALDI: los compuestos desorbidos, que inicialmente tienen una alta densidad de carga, experimentan una reducción de la misma hasta alcanzar estados de carga 1 y 0, debido, en el caso de iones positivos, a la captación de electrones formados en los procesos de fotoionización de la matriz, y en el caso de iones negativos, a la reacción de los mismos con especies protonadas de la matriz [15].

En la realización de experimentos LDI/MALDI podemos diferenciar entre dos etapas de ionización: la ionización primaria, que tiene lugar durante la

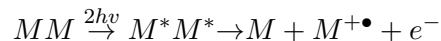
incidencia del láser sobre la muestra, y la ionización secundaria, que tiene lugar en la “pluma” de desorción. Un motivo para separar los mecanismos de ionización en dos pasos es la escala de tiempo: los pulsos láser típicos empleados en MALDI tienen una duración de unos pocos nanosegundos, pero el tiempo durante el cual transcurre la expansión de la pluma y las colisiones entre moléculas es mucho mayor, del orden de microsegundos [36]. Los iones primarios se generan durante el pulso láser o durante el tiempo de vida del estado excitado de la matriz o del analito de interés en experimentos LDI (unos pocos nanosegundos). Tras el pulso láser los iones primarios comienzan a colisionar y a interactuar entre ellos y con las especies neutras en la pluma, dando lugar a reacciones secundarias antes de ser acelerados o durante la propia aceleración, hacia el espectrómetro de masas.

**Mecanismos de ionización primaria.** La ionización primaria o fotoionización consiste en la producción de iones a partir de las moléculas neutras de la muestra tras la absorción de la radiación láser. En experimentos LDI donde se sintoniza el láser a la longitud de onda a la que absorbe el analito que se va a estudiar, la mayor parte de los iones generados en los primeros instantes del proceso son especies derivadas del analito de interés, mientras que en el caso de los análisis MALDI, son especies derivadas de la matriz las que predominan en la pluma en este estadio.

La ionización de una molécula neutra en vacío es un proceso altamente endotérmico debido principalmente a las atracciones de Coulomb que se establecen entre las cargas que se separan. Por lo tanto, se requiere la aplicación de energías significativas comparadas con la energía media de un fotón del láser de nitrógeno para la ionización de la matriz o el analito de interés. La explicación mayormente aceptada para la obtención de iones por excitación láser en la región del ultravioleta cercano es la ionización mediante varios fotones, lo que se conoce como ionización multifotónica (MPI, del inglés *Multi-Photon Ionization*).

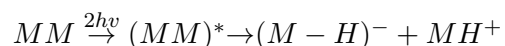
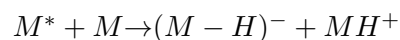
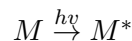


Estos radicales generados en estadios tempranos del proceso de desorción/ionización pueden ser la clave para la obtención de muchos otros iones [37–39] y para explicar las diferencias observadas en los espectros LDI-MS obtenidos al aplicar diferentes retrasos entre la generación y la extracción de iones. Una posibilidad es que dos moléculas de matriz en estado excitado puedan unir sus energías (*pooling*) y generar un radical de matriz ionizado o una molécula de matriz altamente excitada:



En el caso de la técnica MALDI, tras la fotoionización, es la transferencia de un protón desde el estado excitado el modelo de ionización que se propone con más frecuencia, generándose iones mediante la protonación de la matriz. Se supone que una molécula de matriz es mucho más ácida cuando está excitada que en su estado elemental. Las moléculas de matriz en estado neutro aceptarán los protones disponibles antes de que las moléculas excitadas de matriz se relajen.

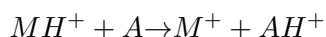
Las reacciones de desprotonación pueden ser también un mecanismo activo de ionización.



En el proceso de desprotonación se produce la excitación de una pareja de moléculas de matriz unidas fuertemente. Este proceso implica un consumo de energía menor del necesario para producir la fotoionización o transferencia del protón desde el estado excitado, seguido de la captura de un protón o electrón.

**Mecanismos de ionización secundaria.** La ionización secundaria es interesante en los experimentos MALDI porque al emplear esta técnica es en ese momento cuando se generan de forma predominante los iones del analito de interés mediante su interacción con la matriz o los iones metálicos presentes en la pluma de desorción [40,41]. El proceso ocurre fundamentalmente mediante protonación, cationización y transferencia electrónica. La

pluma se genera a partir de la rápida transición del estado sólido al gaseoso que sufre la muestra durante el proceso de desorción/ionización láser. De entre todas las reacciones que tienen lugar en la pluma, probablemente la transferencia de protones es la más importante. Cuando los analitos neutros tienen una alta afinidad protónica, mayor que la de la matriz, las reacciones de transferencia de protones desde la matriz protonada al analito son muy eficientes:



Otro mecanismo de ionización que se produce en experimentos LDI/MALDI es la unión no covalente del analito con cationes presentes en la muestra. La interacción del analito de interés con uno o varios cationes puede ser muy útil cuando las especies protonadas dan señales muy débiles, dificultando su detección, o cuando se realizan estudios comparativos de afinidades protónicas y catiónicas. Es común observar en los espectros LDI/MALDI los picos correspondientes al analito de interés unido generalmente a los cationes sodio y potasio, ya que estos se encuentran como impurezas en una gran cantidad de sustancias. En el análisis de polímeros, por ejemplo, suele añadirse a la muestra algún catión para mejorar la señal obtenida, debido a la baja afinidad protónica de estas sustancias. En el caso de experimentos MALDI, la cationización es muy importante para la detección de analitos de baja afinidad protónica (como los polímeros), menor incluso que la de la matriz, ya que deberán competir con la misma por los protones disponibles.

Por otra parte, también se ha demostrado la existencia de reacciones de transferencia de electrones ion-molécula en la pluma para ciertas combinaciones de matriz-analito, siempre y cuando el potencial de ionización de la matriz sea mayor que el del analito en cuestión.



No obstante, este tipo de reacciones no se ha observado ampliamente en UV-MALDI. La transferencia electrónica desde la matriz en estado neutro a iones de analito con doble carga también es posible, obteniéndose iones de analito con carga unidad.

En los experimentos MALDI es habitual observar agregados no covalentes matriz-analito o matriz-matriz, cuyo papel según algunos autores [5], es importante en el proceso de ionización.

El potencial de ionización de los agregados es en general menor que el de las moléculas libres, lo cual es de gran importancia no sólo en las reacciones de ionización primaria (los potenciales de ionización bajos que presentan los agregados posibilitan su ionización multifotónica mediante láseres como el de nitrógeno o el de Nd:YAG (355 nm)), sino también en reacciones de transferencia en la pluma. Por ejemplo, los bajos potenciales de ionización de los agregados impiden que puedan ser ionizados por transferencia de electrones desde iones matriz. A todo esto se suma que la habilidad para donar protones es menor en los agregados protonados que en las correspondientes moléculas libres protonadas.

#### 1.4. Agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI

Como se comentó al principio de este capítulo introductorio el objetivo final de este trabajo es la aplicación de la técnica LDI/MALDI a la caracterización de diversos sistemas moleculares: s-triazinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y asfaltenos; y de sus agregados supramoleculares.

Realizaremos por tanto en este punto una descripción general de los principales procesos de agregación supramolecular que experimentan las especies presentes en la pluma durante los análisis de desorción/ionización láser, para establecer un punto de partida para la discusión de los resultados obtenidos en los experimentos de este estudio que se presentarán en capítulos sucesivos.

La sintonización de la radiación láser en un máximo de absorción de los compuestos de interés permite estudiar mediante LDI los procesos de agregación supramolecular que tienen lugar en la pluma tras la vaporización del material irradiado.

La combinación de las técnicas MALDI y LDI aplicadas al estudio de estos fenómenos de agregación supramolecular contribuirá a dilucidar las

interacciones responsables de la agregación y en qué momento del proceso se generan los *clusters* detectados, así como la influencia del modo de extracción de iones del equipo y el método de preparación de muestras utilizado en la supresión o inducción de dichas interacciones supramoleculares.

Las interacciones que se producen en el entorno densamente poblado de la pluma de desorción pueden ser de naturaleza covalente (reacciones de polimerización) y de naturaleza no covalente. Las interacciones de tipo no covalente responsables de la formación y estabilización de complejos y *clusters* son muy diversas:

1. Fuerzas de Coulomb entre dos cargas. Atractivas y repulsivas, de largo alcance.
2. Interacciones dipolo-dipolo. Atractivas y repulsivas, dependiendo de la orientación angular relativa de los dipolos.
3. Interacciones dipolo-dipolo inducido.
4. Puentes de hidrógeno. Caso particular de fuerzas dipolo-dipolo, pero muy estables.
5. Fuerzas entre cargas y dipolos. Atractivas.
6. Fuerzas entre cargas y dipolos inducidos.
7. Fuerzas entre cargas o dipolos y moléculas no polares.

Como hemos visto anteriormente, durante el proceso de ablación térmica que tiene lugar al aplicar la técnica LDI/MALDI a la caracterización de sustancias diversas, se produce la transferencia a la fase gaseosa de moléculas neutras, iones, *clusters* y fragmentos. Durante el proceso de expansión de la pluma tienen lugar múltiples procesos de interacción entre sus componentes. De este modo, las partículas iónicas y neutras pueden experimentar fenómenos de asociación, responsables de la formación y crecimiento de *clusters* [18]

A pesar de que la técnica MALDI permite la transferencia a la fase gaseosa de complejos supramoleculares de forma intacta (de igual modo que con ESI), preformados en las muestras analizadas, la presencia de un pico en el espectro asociado con

la relación masa/carga de un agregado, no significa que ese agregado estuviera necesariamente en la muestra de partida.

El gran número de interacciones que se produce en la pluma da lugar a la formación y estabilización de nuevas especies a partir de los compuestos originales presentes en la muestra. Y en muchas ocasiones, son estos fenómenos que ocurren fundamentalmente en fase gaseosa, los responsables de la formación de complejos y agregados de diversa naturaleza. Con la aplicación de determinados métodos de preparación de muestras podemos discernir qué especies se están formando en la pluma y cuáles se transfieren directamente desde las muestras analizadas. Con el método *solvent-free* se excluye directamente la pre-formación de complejos tal y como se ha demostrado en diversos estudios realizados por nuestro grupo acerca de los complejos supramoleculares formados por polímeros de diversa longitud de cadena y cationes alcalinos [42, 43].

Las especies atómicas y moleculares y los *clusters* producidos durante el proceso de desorción (o ablación térmica) en vacío, pueden recombinar para formar *clusters* mayores [44]. La presencia de “colisionantes” favorece significativamente la formación de *clusters*, por lo que tanto la incorporación de un gas de fondo en los experimentos LDI/MALDI como las colisiones que se producen en el entorno densamente poblado de la pluma que se genera en este tipo de experimentos promoverán la formación y estabilización de agregados de especies iónicas y neutras [18].

Como hemos visto, la formación de *clusters* en la pluma o su crecimiento a partir de otros más pequeños es un proceso claramente influenciado por la temperatura inicial y la densidad de vapor eyectado tras la irradiación con el láser, y la dinámica de expansión de la pluma en las condiciones que concurren en cada caso (vacío, presencia de gas de fondo, fluencia, longitud de onda y duración del pulso láser). La formación de agregados y su crecimiento tiene lugar en las zonas de la expansión de la pluma donde hay un número importante de colisiones y cesa cuando la expansión entra en el régimen de “expansión libre”, sin colisiones.

También es interesante mencionar el proceso de “nucleación” como mecanismo de crecimiento



de *clusters* en la pluma, a partir de la colisión de iones con otras especies que actúan como núcleos del agregado. Las interacciones de los *clusters* con otras especies presentes en la pluma pueden conducir al reemplazamiento de unos ligandos o sustituyentes por otros, a la neutralización de la carga del *cluster*, a su disociación, etc.

Los agregados pueden estabilizarse en la pluma mediante diversos mecanismos que conducen a la disminución de la energía interna inicial que poseen en el momento de su formación. Tales mecanismos son el enfriamiento colisional o radiativo y la evaporación de moléculas/átomos del agregado.

La forma natural de caracterizar los *clusters* generados en experimentos LDI/MALDI es mediante espectrometría de masas. En nuestros experimentos, las moléculas y *clusters* ionizados presentes en la pluma serán deflectados y acelerados hacia un tubo de tiempo de vuelo, al final del cual impactan en un detector con tiempos de llegada del orden de microsegundos.

Dichos tiempos podrán relacionarse con las masas de las diferentes especies mediante el proceso de calibrado apropiado. En el capítulo 2 se describirán los fundamentos de la espectrometría de masas y en concreto de la de tiempo de vuelo, y se proporciona una descripción detallada del espectrómetro de masas utilizado y aspectos técnicos de interés que afectan a la formación y detección de *clusters* en experimentos LDI.

La pluma de desorción está constituida mayoritariamente por especies en estado neutro, tal y como se ha mencionado anteriormente en el punto 1.3.1. Estas moléculas individuales y *clusters* deben ionizarse para poder detectarse mediante espectrometría de masas. Esto es posible mediante su ionización con un segundo láser que actúe sobre las especies neutras de la pluma (proceso conocido como “pos-ionización”). Este montaje experimental es el que se empleará en el capítulo 5 para la caracterización de sistemas complejos derivados del carbono y sus agregados y se describirá detalladamente en el capítulo siguiente.



---

## Bibliografía

---

- [1] L. Cohen, B.T. Chait. *Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins*. Analytical Chemistry 68 (1): 31-37 (1996)
- [2] P. Juhasz, C.E. Costello, K. Biemann. *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid matrix*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 4 (5): 399-409 (1993)
- [3] R.C. Beavis, B.T. Chait. *Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 3 (12):432-435 (1989)
- [4] M. Karas, U. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarbopoulos, B.N. Pramanik. *Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 67 (3):675-679 (1995)
- [5] M. Karas, R. Krüger. *Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism*. Chemical Reviews 103 (2): 427-439 (2003)
- [6] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. J. Räder, K. Müllen. *New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 15 (15): 1364-1373 (2001)
- [7] S. Trimpin, H.J. Räder, K. Müllen. *Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation. Part I. Preorganization*. International Journal of Mass Spectrometry 253 (1-2): 13-21 (2006)
- [8] S. Trimpin, S. Deune, H.J. Räder, K. Müllen. *Solvent-free MALDI-MS: developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 17 (5): 661-671 (2006)
- [9] L.V. Zhigilei, Y.G. Yingling, T.E. Itina, T.A. Schoolcraft, B.J. Garrison. *Molecular Dynamics simulations of Matrix-Assisted Laser Desorption-Connections to experiment*. International Journal of Mass Spectrometry 226 (1): 85-106 (2003)
- [10] L.V. Zhigilei, E. Leveugle, B.J. Garrison, Y.G. Yingling, M.I. Zeifman. *Computer Simulations of Laser Ablation of Molecular Substrates*. Chemical Reviews 103 (2): 321-347 (2003)
- [11] M. Martín. *Formación de nanoclusters en la ablación láser de materiales: procesos iniciales en la deposición de nanoestructuras*. Optica Pura y Aplicada 37 (2): 43-52 (2004)
- [12] K. Dreisewerd. *The desorption process in MALDI*. Chemical Reviews 103 (2): 395-425 (2003)
- [13] L.V. Zhigilei, B.J. Garrison. *Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes*. Journal of Applied Physics 88 (3): 1281-1298 (2000)

- [14] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp. *Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 141 (2): 127-148 (1995)
- [15] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp. *Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 154 (3): 171-178 (1996)
- [16] K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Breton, M. Spiro, J.C. Blais. *Influence of laser focusing in matrix-assisted laser desorption/ionization*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 8 (3): 242-247 (1994)
- [17] M. von Allmen. *Laser-Beam Interactions with Materials*. Springer: Berlin, 1987.
- [18] A.W. Castleman, JR., R.G. Keese. *Ionic Clusters*. Chemical Reviews 86 (3): 589-618 (1986)
- [19] I.V. Zhigilei. *Dynamics of the plume formation and parameters of the ejected clusters in short-pulse laser ablation*. Applied Physics A 76 (3): 339-350 (2003)
- [20] Q. Lu, S.S. Mao, X. Mao, R.E. Russo. *Delayed phase explosion during high-power nanosecond laser ablation of silicon*. Applied Physics Letters 80 (17): 3072-3074 (2002)
- [21] M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Gluckmann, A. Pfenninger. *The initial-ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI*. International Journal of Mass Spectrometry 226 (1): 239-248 (2003)
- [22] B.N. Kozlov, I.I. Pilyugin, V.G. Shechebelin, A.V. Bulgakov, A.P. Mayorov, M.R. Predtechinskii. *Particle Number Density and velocity distribution in laser plumes*. Microchimica Acta 120 (1-4): 111-119 (1995)
- [23] L.V. Zhigilei, B.J. Garrison. *Velocity distributions of molecules ejected in laser ablation*. Applied Physics Letters 71 (4): 551-553 (1997)
- [24] B. Spengler, D. Kirsch. *On the formation of initial ion velocities in matrix-assisted laser desorption ionization: virtual desorption time as an additional parameter describing ion ejection dynamics*. International Journal of Mass Spectrometry 226 (1): 71-83 (2003)
- [25] S.T. Tsai, C.H. Chen, Y.T. Lee, Y.S. Wang. *Desorption dynamics of neutral molecules in matrix-assisted laser desorption ionization*. Molecular Physics 106 (2-4): 239-247 (2008)
- [26] M. Gluckmann, M. Karas. *The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption ionization*. Journal of Mass Spectrometry 34 (5): 467-477 (1999)
- [27] B. Spengler, V. Bokelmann. *Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B 82 (2): 379-385 (1993)
- [28] A.A. Puretzky, D.B. Geohegan. *LIF imaging and gas-phase diagnostics of laser desorbed MALDI-matrix*. Applied Surface Science 127-129: 248-254 (1998)
- [29] A.A. Puretzky, D.B. Geohegan. *Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes*. Chemical Physics Letters 286 (5-6): 425-432 (1998)
- [30] T. Huth-Fehre, C.H. Becker. *Energetics of gramicidin S after UV laser desorption from a ferulic acid matrix*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 5 (8): 378-382 (1991)

- [31] T. Huth-Fehre, J.N. Gosine, K.J. Wu, et al. *Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of oligodeoxythymidylic acids*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 6 (3): 209-213 (1992)
- [32] J. Elam, D. Levy. *Laser Ablation of Trp-Gly*. The Journal of Physical Chemistry B 102 (41): 8113-8120 (1998)
- [33] H. Arnolds, C. Rehbein, G. Roberts. *Femtosecond Near-Infrared Laser Desorption of Multilayer Benzene on Pt111: A Molecular Newton's Cradle?* The Journal of Physical Chemistry B 104 (14): 3375-3382 (2000)
- [34] H. Arnolds, C. Rehbein, G. Roberts, et al. *Femtosecond near-infrared laser desorption of multilayer benzene on Pt111: spatial origin of hyperthermal desorption*. Chemical Physics Letters 314 (5-6): 389-395 (1999).
- [35] W. Zhao, C. Kim, J. White, et al. *Photodissociation Dynamics of tert-Butyl Nitrite on Ag(111): Characterization of Translationally and Internally Excited NO Fragments*. The Journal of Physical Chemistry A 105 (11): 2234-2239 (2001).
- [36] R. Zenobi, R. Knochenmuss. *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews 17 (5): 337-366 (1998)
- [37] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp. *Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic-molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry*. Organic Mass Spectrometry 27(4): 472-480 (1992)
- [38] P.C. Liao, J. Allison. *Ionization processes in matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry -Matrix-dependent formation of  $[M+H](+)$  VS  $[M+Na](+)$  ions of small peptides and some mechanistic comments*. Journal of Mass Spectrometry 30 (3): 408-423 (1995)
- [39] R. Knochenmuss. *Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI*. Analytical Chemistry 76 (11): 3179-3184 (2004)
- [40] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi. *Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization*. Journal of Mass Spectrometry 35: 1237-1245 (2000).
- [41] R. Knochenmuss, R. Zenobi. *The role of In-plume Processes*. Chemical Reviews 103 (2): 441-452 (2003)
- [42] A.R. Hortal, P. Hurtado, B. Martínez. *Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of gas-phase peptide-metal complexes*. Applied Physics A 93 (4): 935-939 (2008)
- [43] A.R. Hortal, P. Hurtado, B. Martínez-Haya, A. Arregui, L. Bañares. *Solvent-free MALDI Investigation of the Cationization of Linear Polyethers with Alkali Metals*. The Journal of Physical Chemistry B 112 (29): 8530-8535 (2008)
- [44] X-H. Liu, X-G. Zhang, Y. Li, X-Y Wang, N-Q. Lou. *Cluster formation by direct laser vaporization: evidence for the twofold mechanism*. Chemical Physics Letters 288 (5-6): 804-808 (1998)



## CAPÍTULO 2

---

### Metodología

---

En este capítulo se describirá de forma exhaustiva el sistema experimental empleado en la realización de los experimentos de desorción/ionización láser acoplada con espectrometría de masas (LDI/MALDI-TOF) y el conjunto de procedimientos utilizados para la realización de este trabajo de investigación.





## 2.1. Espectrómetro de masas del equipo LDI/MALDI-TOF

Para la realización de los experimentos de desorción/ionización láser acoplada con espectrometría de masas se ha empleado el sistema experimental que muestra el panel superior de la figura 2.1, que está constituido básicamente por las cuatro unidades operativas que recoge el panel inferior de la misma figura:

1. Un espectrómetro de masas de diseño propio, constituido por una cámara de desorción/ionización de alto vacío acoplada a un analizador de masas por tiempo de vuelo.
2. Varios sistemas láser pulsados para desorber e ionizar las muestras.
3. Los dispositivos electrónicos necesarios para alimentar y sincronizar el sistema y para el registro de datos.

En este punto se describirá de forma detallada el espectrómetro de masas del equipo a la vez que se hará referencia al sistema de registro de datos y a la electrónica asociada. En la siguiente sección se describirán los sistemas láser empleados para desorber e ionizar las muestras. El capítulo concluirá con los aspectos metodológicos relacionados con los diversos métodos de preparación de muestras utilizados en este estudio, ya que como se verá a lo largo de este bloque de contenidos, influyen de forma significativa en los resultados obtenidos.

A grandes rasgos podemos afirmar que la espectrometría de masas MALDI-MS constituye una técnica analítica no destructiva que permite identificar y cuantificar una gran variedad de sustancias, siendo posible determinar la composición de muestras complejas y predecir la estructura y propiedades químicas de sus constituyentes. El proceso requiere operar en condiciones de alto vacío y consta básicamente de cuatro etapas:

1. Desorción/ionización de la muestra.
2. Aceleración de los iones generados en un campo eléctrico.

3. Dispersión de los iones según su masa/carga.
4. Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Por tanto, un espectrómetro de masas típico debe estar constituido por (i) un sistema de introducción de muestras en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío; (ii) una cámara de desorción/ionización de la muestra donde se ubica la fuente de iones; (iii) un sistema que permita acelerar los iones generados en la fuente hacia el analizador de masas; (iv) un filtro de iones (o analizador de masas) que es el dispositivo encargado de separar iones en función de su relación masa/carga; y (v) un detector.

Nuestro espectrómetro de masas consta de una cámara de desorción/ionización de diseño propio que aglutina el sistema de entrada de muestras, la fuente y el acelerador de iones (tipo Wiley–MacLaren), y un analizador de masas por tiempo de vuelo comercial (Jordan TOF, Grass Valley, CA, USA). El analizador se puede operar en modo lineal (TOF) o en modo “reflectron” (RETOF). En el segundo caso, los iones se reflejan en una trayectoria en “V” para aumentar la resolución en masas (a costa de reducir la sensibilidad). Los iones se detectan en ambos casos mediante su impacto en una placa multiplicadora de electrones multicanal. Las condiciones de alto vacío requeridas para operar con esta técnica analítica –en torno a  $10^{-7}$  torr– la proporciona la acción combinada de dos bombas de vacío turbomoleculares de 700 y 300  $l s^{-1}$  (Varian TV701 y TV301) acopladas, respectivamente, a la fuente de iones y al tubo de tiempo de vuelo. El vacío previo se realiza con dos bombas rotatorias modelo Varian DS402 y DS102.

En un experimento típico LDI/MALDI-TOF el portamuestras se inserta en la placa repulsora de la fuente de iones, incidiendo el haz láser en la superficie del mismo con un ángulo de 45 grados. Los iones generados por la interacción de los pulsos láser con la muestra son extraídos de forma continua durante el proceso o bien con un cierto retraso con respecto al disparo del láser. En la mayoría de los casos se ha operado en modo “reflectron” (RETOF), con potenciales típicos de aceleración de 4.2 kV y potenciales de reflexión de los iones de 4.3 kV. La señal obtenida se visualiza en un os-

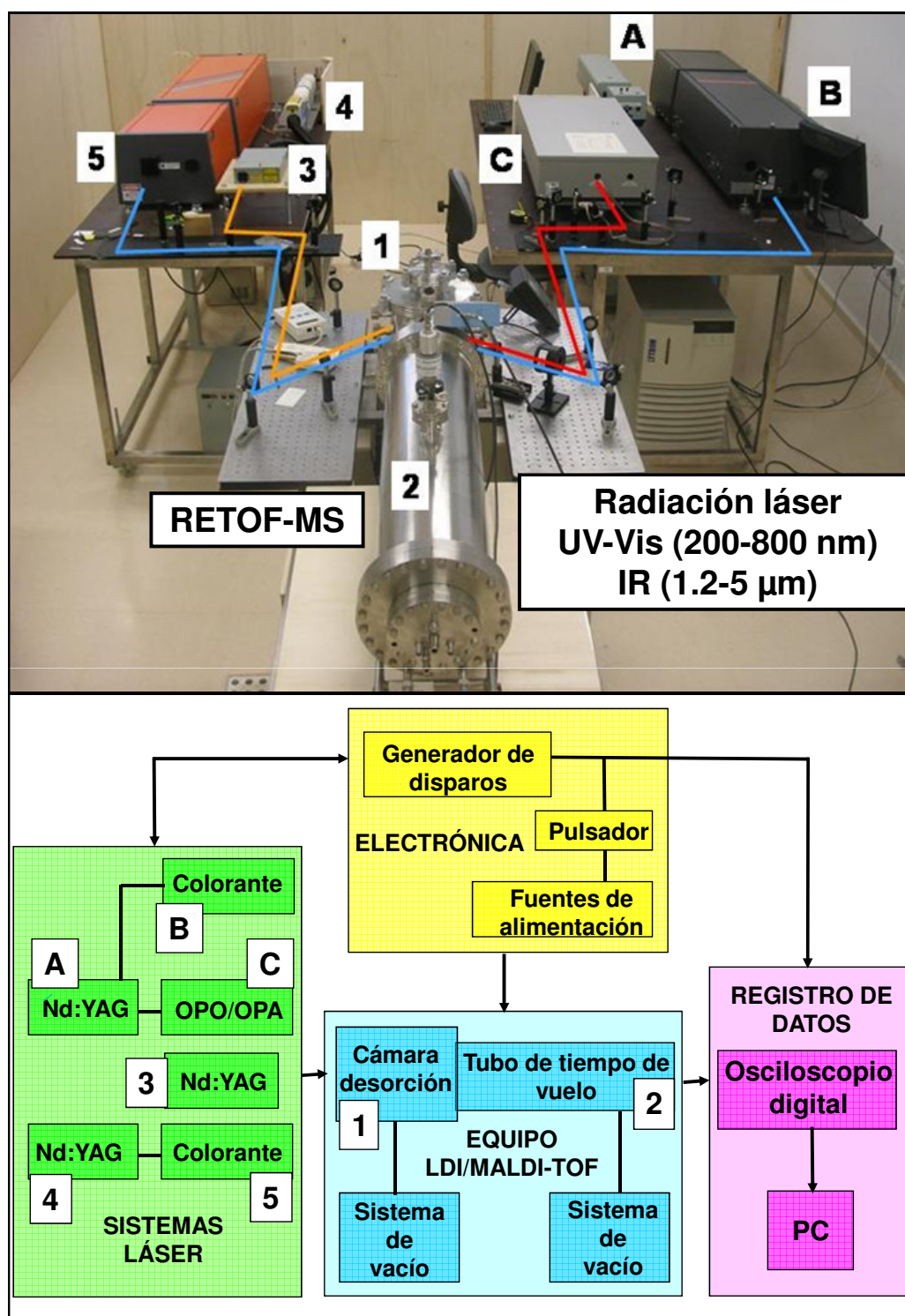


Figura 2.1: **Sistema experimental empleado en los experimentos LDI/MALDI-TOF.** El panel inferior muestra un esquema de las unidades operativas que conforman el sistema: un equipo LDI/MALDI-TOF de diseño propio constituido por un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (1, 2); varios sistemas láser para desorber e ionizar las muestras (3, 4, 5 y A, B y C); un sistema de registro de datos y los dispositivos electrónicos necesarios para alimentar el sistema y sincronizarlo. El panel superior muestra una fotografía de la disposición en nuestro laboratorio de los sistemas láser utilizados y el espectrómetro de masas.

ciloscopio digital (Yokogawa DL7100) conectado a un ordenador. La sincronización del sistema se lleva a cabo mediante un generador de disparos de retardo múltiple (BNC 575).

Las figuras 2.1, 2.2 y 2.3 muestran de forma esquemática el espectrómetro de masas y la cámara de desorción/ionización, respectivamente, con sus componentes principales.

La cámara de desorción e ionización está fabricada en acero inoxidable. Posee una entrada a través de la cual se inserta el portamuestras, y seis ventanas de cuarzo, cinco de las cuales están diseñadas para permitir la entrada del haz láser en la misma, tal y como muestra la figura 2.3. La otra ventana (ventana 6 en la figura 2.2) permite observar la muestra y controlar el enfoque del haz sobre la misma. El portamuestras utilizado consiste en un cilindro de acero inoxidable de 6,6 mm de diámetro y 9 mm de altura, acoplado por una de sus caras al extremo de una varilla que permite su inserción en la cámara. Las muestras se depositan en la otra cara, que se inserta en un orificio practicado en la placa repulsora (A1) de la fuente de iones.

La radiación láser se dirige hacia la muestra mediante la óptica adecuada, enfocándose sobre ella con una lente de focal de 20–25 cm situada en el exterior de la cámara. En el caso de experimentos en los que se emplea un segundo láser de ionización, éste se introduce en la cámara de forma paralela a la placa repulsora (a través de la ventana 2 de la figura 2.3), enfocándose a unos milímetros de distancia de la superficie de la muestra, como ilustra la figura 2.5.

La fuente y el acelerador de iones están constituidos por un conjunto de tres placas, una placa repulsora (A1) en la que queda inserta la muestra, una placa extractora (A2) situada a 13,5 mm de la anterior y una tercera placa, también situada a 13,5 mm de la placa extractora que está conectada a tierra, y a partir de la cual comienza el vuelo libre de los iones. La figura 2.4 muestra de forma esquemática el conjunto de placas que constituye la fuente de iones y el principio de la región de vuelo libre.

Una fuente de alimentación de alto voltaje sintonizable (AREF, de Jordan) es la encargada de suministrar a las placas el voltaje necesario para acelerar los iones generados. Cuando el equipo opera en condiciones de extracción pulsada de iones son unos interruptores rápidos de alto voltaje (Behlke modelo HTS 61-03-GSM) los que de forma sincronizada con el disparo del láser, permiten el suministro del voltaje a las placas durante varios milisegundos, transcurrido un cierto tiempo desde que el haz incide en la muestra. Los retrasos típicos aplicados oscilan entre unos cientos de nanosegundos y un microsegundo. La implantación y optimización de la fuente pulsada ha sido realizada por nuestro grupo. Los voltajes típicos suministrados a las placas de la fuente de iones en los experimentos realizados en este estudio son 4200 V (A1) y 3500 V (A2) cuando se configura el espectrómetro de masas en modo lineal (TOF-lineal), y 4400 V (A1) y 3310 V (A2) cuando se configura en modo *reflectron* (RETOF). Una vez que deja de actuar el campo eléctrico, los iones vuelan libremente desde la placa conectada a tierra hasta alcanzar el detector MCP.

Un par de placas deflectoras dispuestas a continuación de la fuente de iones permiten aplicar un campo eléctrico perpendicular al eje de propagación de los iones con el fin de dirigir las partículas cargadas hacia el detector MCP localizado al final del tubo de tiempo de vuelo que no está centrado con el eje de la fuente, y de corregir posibles desviaciones de sus trayectorias. El valor típico de este potencial ( $V_{xy}$ ) es de 75 V cuando se opera en modo TOF-lineal y de 200 V cuando se trabaja en RETOF.

El analizador de masas por tiempo de vuelo permite trabajar en las condiciones descritas en modo lineal (TOF) y en modo de reflexión (RETOF). El uso de un *reflectron* o “espejo iónico” permite reflejar los iones prácticamente 180° mediante un campo electrostático, de manera que iones con igual relación masa/carga ( $m/z$ ) pero que viajen con distinta energía cinética en el tubo de vuelo penetrarán en el *reflectron*, tardando más en ser reflejados aquellos que viajaban a mayor velocidad.

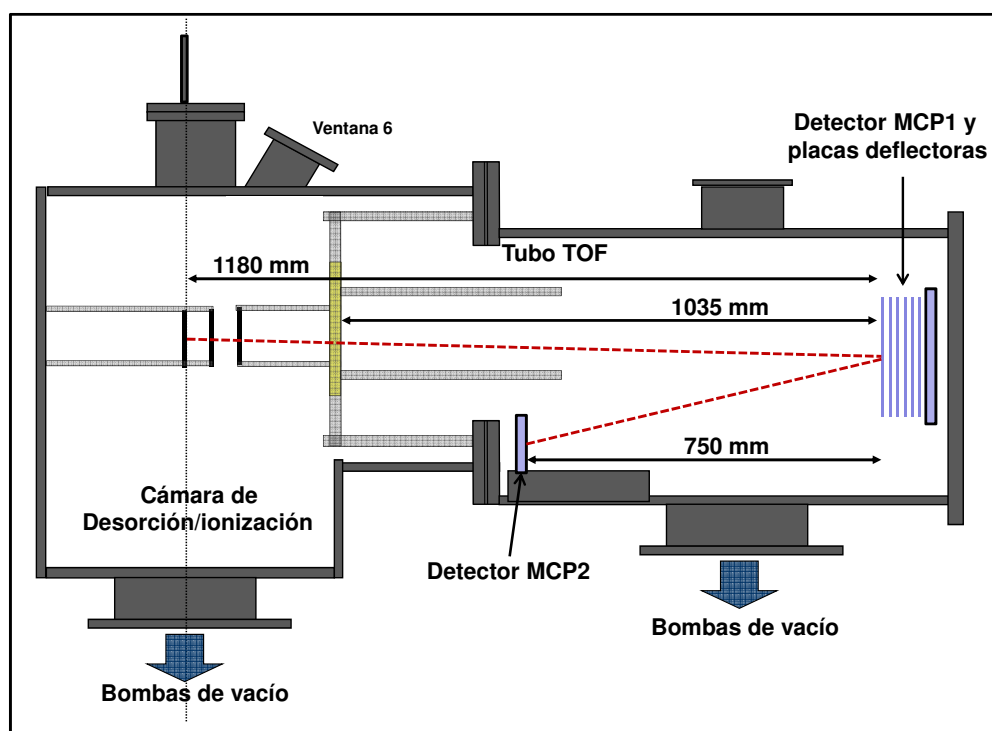


Figura 2.2: **Esquema del espectrómetro de masas del equipo LDI/MALDI.** Puede observarse la cámara donde se encuentra la fuente de iones y el tubo de tiempo de vuelo con los dos detectores MCP, así como el sistema de alto vacío asociado.

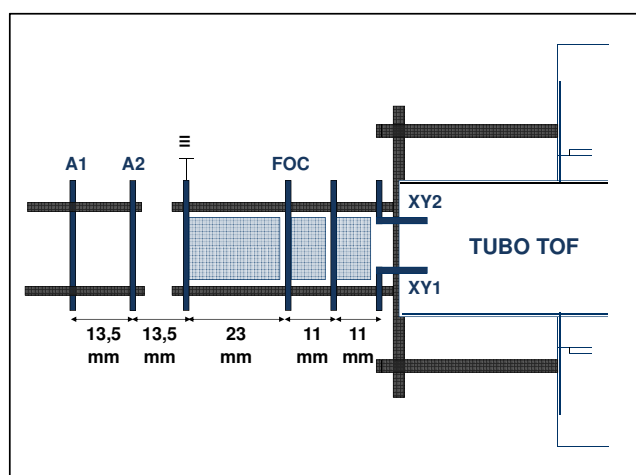


Figura 2.4: **Esquema del conjunto de placas que constituye la fuente de iones y el principio de la región de vuelo libre.** El sistema cuenta con una placa repulsora (A1) en la que queda inserta la muestra, una placa extractora (A2) situada a 13,5 mm de la anterior y una tercera placa, también situada a 13,5 mm de la anterior que está conectada a tierra, y a partir de la cual comienza el vuelo libre de los iones

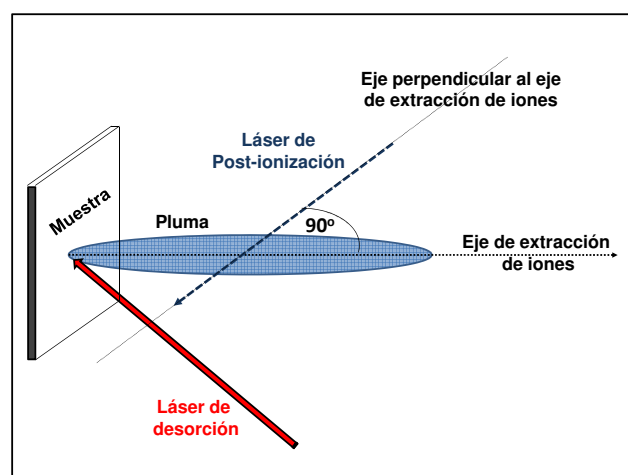


Figura 2.5: **Esquema del sistema experimental empleado en experimentos de "pos-ionización" de especies neutras presentes en la pluma de desorción.** En nuestro montaje experimental el haz del láser que ioniza los neutros atraviesa la pluma en dirección perpendicular a la dirección de propagación de la misma y al eje del espectrómetro de masas.

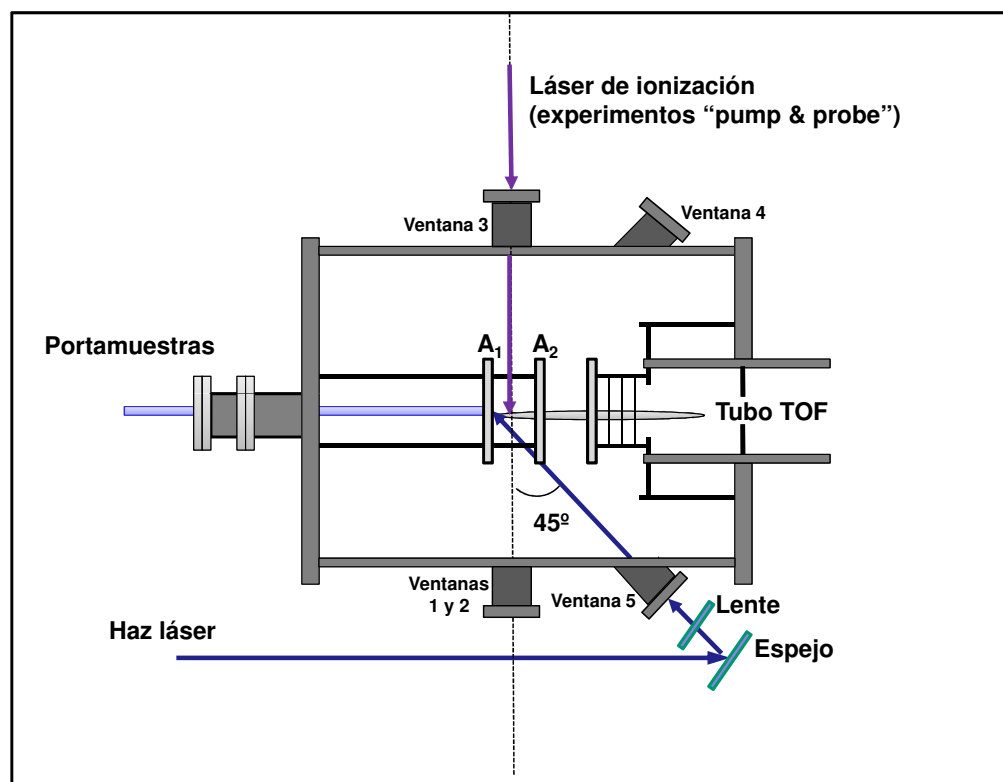


Figura 2.3: Esquema de la cámara de desorción/ionización del equipo LDI/MALDI-TOF. La figura muestra la fuente de iones y el principio de la región de vuelo libre. También se muestra la inserción de la muestra en la fuente y la incidencia del haz láser sobre la misma.

De esta manera, se produce una reagrupación cinética de los iones con igual relación  $m/z$  en su llegada al detector, lo cual se traduce en una mayor resolución en masas. El *reflectron* está compuesto por un conjunto de 20 placas a las que se aplica un gradiente de potencial de unos  $135 \text{ Vcm}^{-1}$  mediante la aplicación de potenciales de 3000 V (R1) y 4300 V (R2) a la primera y última placa del conjunto, respectivamente.

La detección de iones se lleva a cabo con placas multiplicadoras de electrones multicanal (MCP) de 18 mm y 40 mm de diámetro para las medidas en modo TOF y RETOF, respectivamente. A las placas se les aplica un potencial típico de 1000-1330 V —lo que supone entre 3000-4000 V en la fuente de alimentación, potencial que se divide en un factor de 3 al repartirse entre los distintos componentes del sistema de detección—. La corriente de iones generada en los MCP debido al impacto de

los iones se recoge en un osciloscopio digital rápido de cuatro canales y se sincroniza con el disparo del sistema láser para determinar el eje de tiempo de vuelo. De esta manera, para cada disparo láser se obtiene una representación gráfica donde se observa el tiempo de vuelo de cada ion y su correspondiente abundancia. El osciloscopio permite promediar los valores obtenidos en varios disparos y obtener una representación del promedio. En los experimentos recogidos en los siguientes capítulos se promediaron los espectros sobre 128 disparos láser. El espectro promedio se transfirió finalmente a un ordenador.

La sincronización de todo el sistema se lleva a cabo mediante dos generadores de disparos de retardo múltiple (BNC 575). Este tipo de dispositivos permite generar impulsos que controlan las señales de disparo de los distintos equipos del sistema experimental, para que se activen con retrasos

variables con respecto a un disparo principal. Ambos generadores proporcionan pulsos de tipo TTL sincronizados con una señal de disparo principal externa, o bien con una señal interna del sistema. En nuestro caso todo el sistema funciona con una frecuencia de repetición de 10 Hz.

### 2.1.1. Calibración en masas

Todo experimento LDI/MALDI-TOF requiere una calibración en masas que permita realizar una asignación de los picos que aparecen en el espectro. En nuestro caso hemos empleado un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, un analizador de masas que se basa en el principio de que todas las especies cargadas sometidas a la misma diferencia de potencial alcanzarán la misma energía cinética terminal. De esta forma, iones con distinta relación masa/carga alcanzarán el detector a diferentes tiempos, tal y como muestra la figura 2.6.

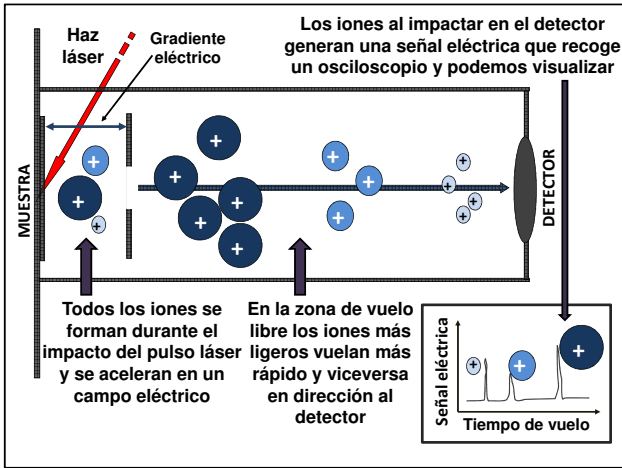


Figura 2.6: Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). Las especies cargadas se someten a la misma diferencia de potencial, lo que les confiere la misma energía cinética. Como los iones poseen igual energía cinética pero distinta masa, los más ligeros avanzarán más rápido que los más pesados en la región de vuelo libre, alcanzando el detector a diferentes tiempos.

La energía cinética ( $E_{cin}$ ) del ion es proporcional al campo eléctrico aplicado ( $E$ ), lo cual redundará en una velocidad iónica ( $v$ ) proporcional a la raíz cuadrada del cociente masa/carga ( $m/z$ ):

$$E_{cin} = \frac{1}{2}mv^2 = zE \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2E}{m/z}}$$

Partiendo de esta expresión y utilizando relaciones cinéticas sencillas, se obtiene la siguiente expresión para el tiempo de llegada de los iones al detector al operar en modo lineal (TOF):

$$t = \sqrt{\frac{m}{2qU_{A1}}} \left[ c\sqrt{k} + d \left( \sqrt{k+p} - \sqrt{k} \right) + \frac{1}{\sqrt{k+p}} \right] x_{SF}$$

$$\text{siendo: } c = \frac{2x_{A1}}{x_{SF}} \quad d = \frac{2x_{A2}}{x_{SF}} \frac{U_{A1}}{U_{A2}} \quad \text{y } p = \frac{U_{A1}}{U_{A2}}$$

$x_{A1}$  es la distancia entre las placas repulsora (A1) y extractora (A2);  $x_{A2}$  es la distancia entre la placa repulsora (A2) y la entrada a la región de vuelo libre;  $x_{SF}$  es la distancia libre de campo recorrida por los iones;  $U_{A1}$  es la diferencia de potencial entre las placas extractora y repulsora;  $U_{A2}$  es la diferencia de potencial entre la placa repulsora (A2) y la entrada del tubo de vuelo;  $k$  es un parámetro que puede tomar valores entre 0 y 2 que hace referencia al punto espacial en que se produce la ionización de los analitos:  $k=2$  corresponde a la ionización sobre la placa repulsora (típica en LDI/MALDI), mientras que  $k < 2$  corresponde a la pos-ionización de neutros en la pluma de desorción ( $k=1$  si la ionización se lleva a cabo en el punto medio entre las placas repulsora y extractora).

La expresión análoga para el modo RETOF es la siguiente:

$$t = \sqrt{\frac{m}{2qU_{A1}}} \left\{ 2x_{A1}\sqrt{k} + 2x_{A2}\frac{1}{p} \left( \sqrt{k + \frac{1}{p}} - \sqrt{k} \right) + \frac{L}{\sqrt{k+p}} + \frac{4x_R}{\gamma} \frac{1}{p} \sqrt{k - \frac{1}{p}} \right\}$$

$$\text{siendo } \gamma = \frac{U_R}{U_{A1} + U_{A2}}$$

$x_R$  es la distancia entre la primera y la última de las placas deflectoras;  $U_R$  es la diferencia de potencial entre la primera y la última placa deflectora;

$L$  es la distancia entre la primera de las placas deflectoras y el detector.

Las expresiones anteriores nos servirán para predecir los tiempos de detección de los analitos de interés y planificar la calibración del equipo con patrones externos o internos. Para la calibración en masas de los espectros LDI/MALDI del presente estudio se han obtenido varias rectas de calibrado correspondientes a diferentes intervalos de masas, diferentes patrones, diversos métodos de preparación de muestras y diversas energías láser, que son válidas para los experimentos realizados en tales condiciones experimentales.

A continuación se detalla un proceso de calibración utilizando como patrones diversos hidrocarburos poliaromáticos (PAHs). Para realizar la calibración en masas del equipo se prepararon disoluciones de cada uno de los patrones en tolueno, utilizando ditranol como matriz. Se aplicaron pulsos láser de 266 nm con energías de  $15 \mu\text{J}$ . Un espectro típico obtenido puede observarse en la figura 2.7. Los tiempos de vuelo de cada uno de los patrones, así como la resolución en masas ( $M/\Delta M$ ) de los distintos picos obtenidos en el espectro se detalla en la tabla 2.1.

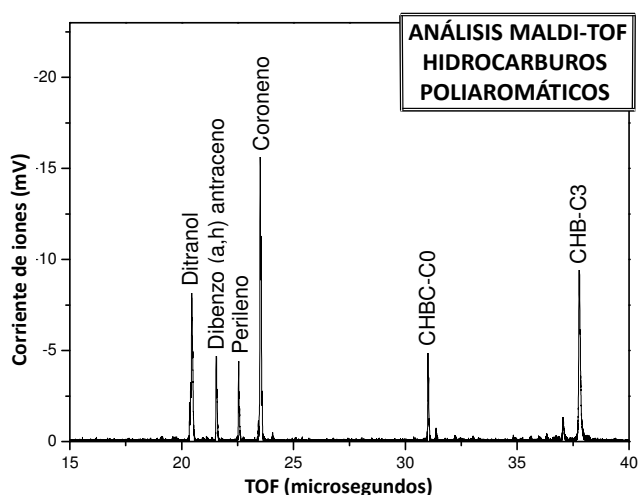


Figura 2.7: Espectro MALDI-TOF de varios hidrocarburos poliaromáticos empleados como patrones para calibrar el equipo. Matriz empleada: ditranol. Energía por pulso láser de 266 nm:  $15 \mu\text{J}$ .

Con los resultados obtenidos se representa el valor del tiempo de vuelo frente a la raíz cuadrada del peso molecular del patrón y se realiza una re-

gresión lineal, obteniéndose una recta de calibrado que nos permitirá en análisis posteriores relacionar la masa de un compuesto con su tiempo de vuelo, como muestra la figura 2.8. Las rectas de calibrado obtenidas en los procesos de calibración son válidas para el calibrado de distribuciones de masas comprendidas en el intervalo de masas delimitado por los patrones.

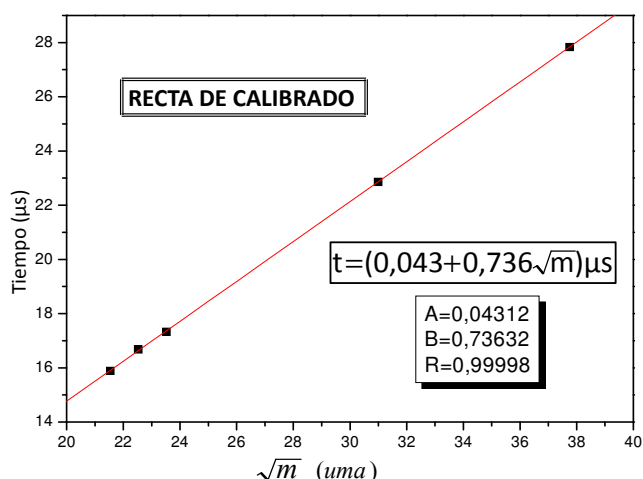


Figura 2.8: Regresión lineal: representación del tiempo de vuelo de los patrones frente a la raíz cuadrada de la masa en cada caso.

### 2.1.2. Puesta a punto del sistema de extracción pulsada de iones

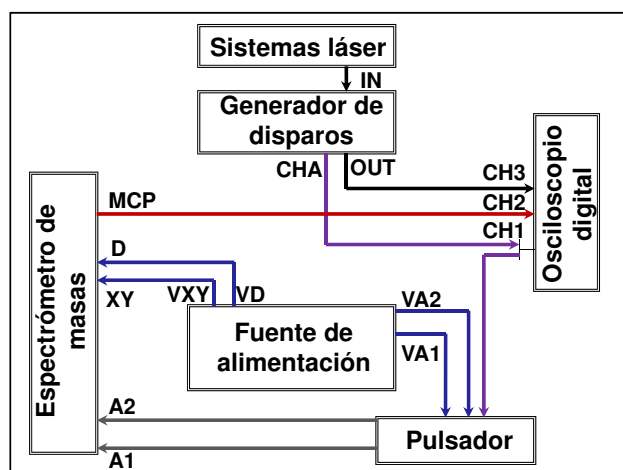
Como parte de este proyecto de tesis se implementó en la fuente de iones un sistema de extracción pulsada con el objetivo fundamental de incrementar de forma notable la resolución en masas del equipo. La extracción pulsada permite acelerar en un mismo instante todos los iones presentes en la pluma de desorción, a diferencia de la extracción continua en la que cada ion es acelerado desde el momento de su generación. Adicionalmente, la comparación de experimentos con extracción pulsada y continua nos ha permitido estudiar diversos procesos dinámicos que tienen lugar durante la desorción, en particular los relacionados con la formación de agregados supramoleculares.

Para implantar la fuente pulsada en el equipo se incorporaron dos interruptores rápidos de alto voltaje conectados a la fuente de alimentación de



Tabla 2.1: Denominación y peso molecular del isótopo principal (g/mol) de una serie de hidrocarburos poliaromáticos empleados como patrones para calibrar en masas el equipo. Se indican los tiempos de vuelo y la resolución en masa ( $M/\Delta M$ ) obtenidos en cada caso en experimentos LDI a 266 nm.

| PAHs                         | Peso molecular (g/mol)                    | M/ $\Delta$ M | Tiempo de vuelo ( $\mu$ s) |
|------------------------------|---|---------------|----------------------------|
| Perileno                     | 252,09 (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> ) | 180           | 21,54                      |
| Dibenzo(a,h)antraceno        | 278,11 (C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> ) | 361           | 22,53                      |
| Coroneno                     | 300,09 (C <sub>24</sub> H <sub>12</sub> ) | 173           | 23,52                      |
| Hexabenzocoroneno            | 522,14 (C <sub>42</sub> H <sub>18</sub> ) | 637           | 30,99                      |
| Hexapropil-hexabenzocoroneno | 774,42 (C <sub>60</sub> H <sub>54</sub> ) | 241           | 37,75                      |



**Figura 2.9: Conexiones entre los distintos componentes del sistema experimental:** sistemas láser, generador de disparos, pulsador, osciloscopio digital, fuente de alimentación (que aplica los voltajes correspondientes a las placas repulsora (A1), extractora (A2), deflectoras (VXY) y al detector (VD)) y espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

las placas repulsora y extractora. Se utilizaron interruptores de la empresa Behlke, modelo HTS 61-03-GSM, con tiempos de activación de 10 ns.

La figura 2.9 muestra de forma esquemática las conexiones entre los distintos componentes del sistema experimental al incorporar la fuente pulsada y con el equipo configurado en modo TOF-lineal. En este ejemplo el esquema de funcionamiento es el siguiente: el disparo del *Q-switch* del sistema láser actúa como señal principal de sincronización del sistema. Esta señal se conecta a la entrada del generador de disparos de retardo múltiple y se visualiza en el osciloscopio. Una señal retrasada con respecto del pulso de disparo del láser es la encargada de activar los interruptores rápidos que inician la aplicación de los voltajes de extracción a

las placas repulsora y extractora. Esta señal actúa además como inicio del “reloj” del tiempo de vuelo. La activación de los interruptores se mantiene en nuestros experimentos durante unos 5 ms, tiempo más que suficiente para garantizar la extracción de todos los iones generados.

En la práctica, existe un pequeño desfase entre el tiempo de retraso fijado para la aplicación del potencial de extracción y el momento en que efectivamente esto ocurre.

Para medir el tiempo real que transcurre entre la generación de iones y su extracción de una forma más precisa, se monitorizaron en el osciloscopio las siguientes señales: a) señal principal: disparo del láser (conectada a la entrada del generador de disparos como *trigger*), b) llegada del pulso láser a la cámara de desorción, c) salida de la señal principal sin fijar ningún retraso, d) pulso que dispara el interruptor y e) aplicación del potencial de extracción.

En nuestro caso, medimos experimentalmente que al tiempo de retraso seleccionado en el generador de disparos había que sumar 217 ns, correspondientes al desfase temporal que existe entre el disparo del interruptor y la aplicación del potencial de extracción —179 ns, desfase entre d) y e)—; y también al tiempo que transcurre entre la llegada del pulso láser a la cámara de desorción y la salida de la señal de dicho pulso del generador de disparos —38 ns, desfase entre b) y c)—.

En los capítulos sucesivos el tiempo de retraso que se indica en los análisis LDI/MALDI es siempre el que se selecciona en el generador de disparos, por lo que el desfase real será siempre unos 200 ns mayor.



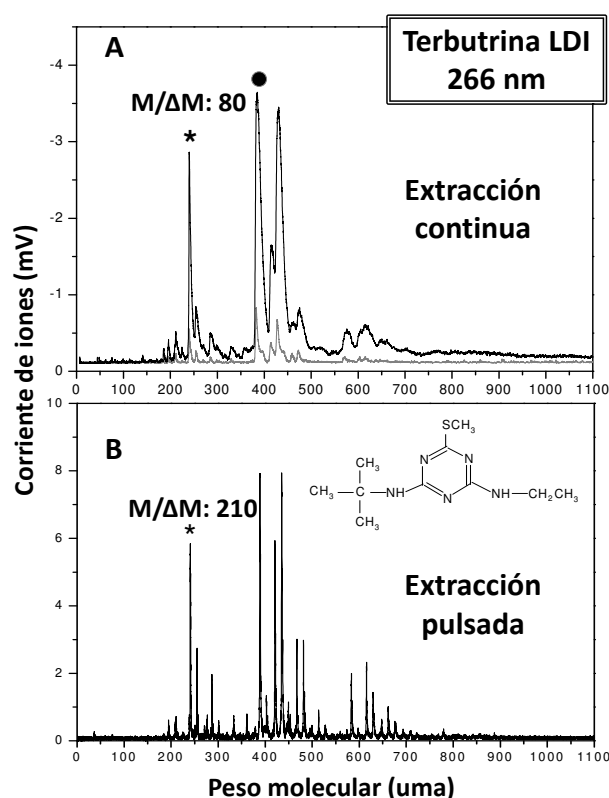


Figura 2.10: Efecto de la extracción pulsada de iones sobre la resolución en masas del equipo. Espectro LDI de la terbutrina registrado en modo de extracción continua (A) y pulsada (B) de iones. La resolución en masas para el pico de la terbutrina aumenta en un factor de 3 al emplear la fuente pulsada (retraso aplicado de 1  $\mu$ s).

### Optimización de la resolución en masas

La incorporación de la fuente pulsada de iones incrementó la resolución en masas del equipo hasta en un factor de 5 en la zona de masas comprendida en el intervalo  $m/z$ : 500–1000.

La figura 2.10 ilustra de forma cualitativa este aspecto para espectros de terbutrina ( $m/z=241$ ) en el que se aprecia como aumenta la resolución en un factor de 3 aproximadamente al pulsar la extracción, sin optimización de ningún parámetro adicional. Como es habitual en este campo, la resolución se expresa en términos del cociente  $M/\Delta M$  (siendo  $M$  la masa del compuesto y  $\Delta M$  la anchura del pico a media altura).

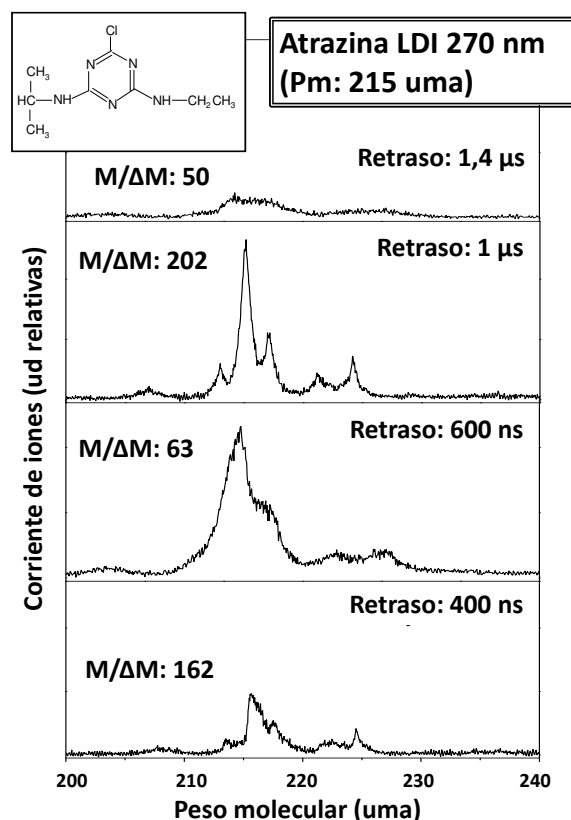


Figura 2.11: Efecto de la variación del tiempo de retraso entre la generación y extracción iónica sobre la resolución en masas en espectros LDI de la atrazina. El valor de la resolución en masas ( $M/\Delta M$ ) indicado corresponde al pico de la atrazina (p.m.: 215 uma). El tiempo de retraso aplicado se indica en cada panel.

Para optimizar la resolución en masas en cada tipo de experimento realizado es necesario ajustar el tiempo de retraso aplicado entre la generación y la extracción de los iones durante el proceso de desorción/ionización láser. A diferencia de los equipos MALDI comerciales, en los que típicamente sólo pueden seleccionarse unos pocos tiempos de retraso fijos, nuestro equipo permite establecer cualquier tiempo de retraso en la extracción iónica, con la única limitación de las características del generador de disparos que se utilice para la sincronización del sistema experimental.

Antes de realizar los experimentos LDI/MALDI de las distintas especies consideradas en este trabajo, se ha realizado un estudio del tiempo de retraso

óptimo para el análisis de cada una de ellas. Los retrasos óptimos no suelen variar demasiado entre las especies consideradas, obteniendo los espectros mejor resueltos y con picos más intensos al aplicar retrasos en torno a  $1\mu\text{s}$ , como muestra la figura 2.11.

### Efecto de la extracción pulsada sobre la dinámica de la pluma

Además de la mejora de la resolución en masas del equipo que se obtiene al trabajar con la fuente pulsada, se observan importantes variaciones en los procesos de agregación que tienen lugar en la pluma de desorción en función de la configuración de la extracción iónica.

Tras realizar análisis sistemáticos de especies que presentan una alta propensión a formar agregados en nuestras condiciones experimentales (como los hidrocarburos poliaromáticos) se llegó a la conclusión de que el proceso de formación de agregados resulta considerablemente más eficiente cuando se extraen los iones de forma continua, o lo que es lo mismo, cuando no se impone ningún retraso entre su formación y su extracción de la fuente.

La figura 2.12 muestra dos espectros LDI del coroneno (un hidrocarburo poliaromático), obtenidos en modo de extracción pulsada (A) y continua (B) de iones y en idénticas condiciones de energía láser y densidad superficial de analito. En ambos casos se ha ampliado la zona correspondiente a las masas mayores para mostrar en detalle los picos correspondientes a los agregados de mayor número de unidades. Mientras que al trabajar en modo de extracción continua se generan agregados de hasta 8 unidades, con la fuente pulsada tan solo se observan agregados de hasta 5 unidades. Este efecto se observa para todos los hidrocarburos poliaromáticos analizados en este estudio: benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, perileno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno, coroneno y hexabenzocoroneno, como se mostrará en el capítulo 4.

El efecto de mayor agregación al operar en condiciones de extracción continua es consistente con la formación de estos agregados mayoritariamente

en la pluma de desorción y puede estar relacionado con el hecho de que los iones generados en estadios tempranos del proceso de desorción/ionización, se comporten como núcleos para la formación de agregados durante el proceso de extracción iónica.

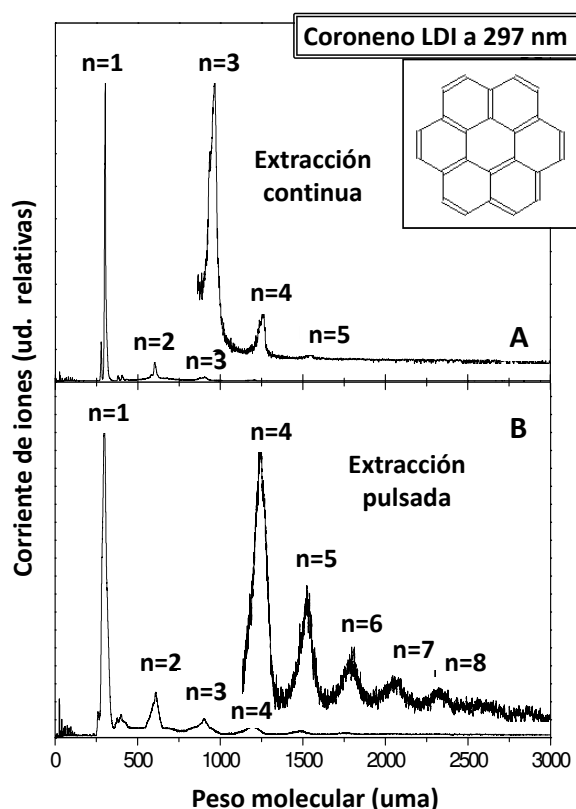


Figura 2.12: **Efecto del modo de extracción iónica del equipo (continua vs pulsada) en la formación de agregados.** La figura muestra espectros LDI del coroneno obtenidos en modo de extracción continua y pulsada de iones medidos en muestras preparadas con el método *solvent-free*. Se han aplicado energías por pulso láser de 297 nm de  $30\mu\text{J}$ . El número de agregados detectados disminuye al emplear la fuente pulsada (a) frente al espectro registrado operando en modo de extracción continua de iones (b).

Cuando no se aplica ningún retraso entre la generación y la extracción de iones, las partículas cargadas que se generan, se aceleran y son extraídas por el campo eléctrico a través del entorno densamente poblado de la pluma de desorción antes de que tenga lugar una expansión significativa.

Cuando se emplea la extracción pulsada, con retrasos típicos de cientos de nanosegundos, los iones coexpanden con la pluma e interaccionan con las moléculas vecinas de un modo más térmico. De acuerdo con los experimentos realizados, la aceleración sufrida por los iones en estadios tempranos durante el proceso de desorción provoca que tengan lugar fenómenos de agregación más eficientes de las especies implicadas. El mismo efecto se observa en el análisis LDI de otros sistemas, como los compuestos derivados del carbono de mayor complejidad [1].

## 2.2. Sistemas láser

Para desorber e ionizar las muestras en los experimentos LDI/MALDI-TOF se han empleado tres sistemas láser:

1. Láser de Nd:YAG (Minilite II, Continuum)
2. Láser sintonizable de colorante de emisión ultravioleta (ScanMate, Lambda Physik; bombeo: Brilliant b, Quantel )
3. Láser sintonizable de emisión infrarroja tipo OPO/OPA (LaserVision; bombeo: Surelite, Continuum)

### 2.2.1. Láser de Nd:YAG

Uno de los dispositivos láser empleados en el presente estudio es un Nd:YAG modelo Minilite II, de Continuum. Un láser de Nd:YAG (acrónimo del inglés *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*) es un láser de estado sólido que utiliza el dopaje con neodimio de cristales de óxido de itrio y aluminio como medio de ganancia, para la amplificación de su radiación de longitud de onda característica de 1064 nm. El bombeo del medio de ganancia se realiza mediante el disparo pulsado de una lámpara flash y la amplificación de la radiación se realiza mediante dos espejos situados a ambos lados del medio activo. El Minilite II utiliza la técnica de *Q-switching* para conseguir grandes inversiones de población y obtener pulsos láser más estrechos e intensos. La duración de los pulsos es de 7 ns y la frecuencia de repetición es de 10 Hz.

En la realización de los experimentos se han utilizado principalmente el tercer y cuarto armónicos de la frecuencia fundamental (1064 nm): 355 y 266 nm, respectivamente. Para la obtención de los mismos el Minilite cuenta con cristales KTP (*Potassium Titanyl Phosphate*) y BBO (*Beta-Barium Borate*). En el caso del láser de Nd:YAG la radiación de 532 nm se consigue mediante dos fotones de 1064 nm que penetran en un cristal doblador de manera colineal, obteniéndose un fotón del doble de frecuencia pero que conserva la energía y el momento de los fotones incidentes en el cristal. La conservación del momento angular se traduce en la variación en 90° de la polarización del fotón producido.

El proceso de triplicado de frecuencias (generación de tercer armónico, 355 nm) es un proceso similar. En este caso combinamos un fotón de la frecuencia fundamental con uno ya doblado. La salida del cristal doblador ya contiene necesariamente estos dos fotones. Por tanto, haciendo incidir el haz de luz que sale del cristal doblador sobre otro cristal, se combinan el fotón doblado y el fundamental.

La generación de cuarto armónico consiste simplemente en un doble proceso de doblado. La luz de 532 nm que sale del cristal doblador entra en un segundo cristal doblador que la dobla nuevamente, obteniéndose fotones de 266 nm. Finalmente, un conjunto de espejos dicróicos separa la frecuencia de salida de la radiación residual.

La energía máxima aproximada proporcionada por el Minilite II cuando se trabaja en su frecuencia fundamental y con sus armónicos es la siguiente:

1. 1064 nm: 50 mJ/pulso
2. 532 nm: 30 mJ/pulso
3. 355 nm: 9 mJ/pulso)
4. 266 nm: 5 mJ/pulso

Ya se mencionó más arriba que para la realización de este trabajo se utilizaron el tercer y cuarto armónicos (355 y 266 nm, respectivamente), pero atenuando la energía de salida para conseguir energías por pulso láser de entre 5 y 150  $\mu$ J. Esto

se consigue mediante una lámina retardadora que regula la intensidad del haz de 1064 nm previamente a la generación de los armónicos.

### 2.2.2. Láser ultravioleta sintonizable

El sistema experimental dispone de un láser sintonizable en la región ultravioleta-visible, compuesto por un láser de colorante (modelo ScanMate de Lambda Physik) bombeado por un Nd:YAG (modelo Brilliant b de Quantel). Concretamente se utiliza el segundo armónico del Brilliant como bombeo del colorante, empleando para el doblado de la frecuencia fundamental un cristal de tipo KDP (*potassium dideuterium phosphate*). La energía de salida se regula controlando el retraso entre el *Q-switch* y el disparo de la lámpara flash, o bien mecánicamente, modificando la posición del cristal doblador. La energía máxima proporcionada por el Brilliant en su emisión fundamental y segundo armónico es de 360 y 180 mJ/pulso, respectivamente. La frecuencia de repetición es de 10 Hz.

El láser de colorante utiliza como medio activo una disolución de un colorante orgánico, en nuestro caso la rodamina 6G con concentraciones que oscilan entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  M. El máximo de absorción de la rodamina utilizada se produce a 533 nm y su máximo de emisión de fluorescencia tiene lugar a 556 nm. El bombeo se lleva a cabo mediante el segundo armónico del láser de Nd:YAG (532 nm). La sintonización se consigue mediante una red de difracción que se encuentra en la cavidad y que induce la amplificación de una longitud de onda específica según su ángulo con respecto al eje del resonador. El dispositivo cuenta además con un preamplificador: una misma célula de colorante puede funcionar al mismo tiempo como componente del oscilador y como una célula amplificadora, mediante el bombeo en dos regiones distintas de la célula. Este sistema reduce la mayor parte de la emisión espontánea amplificada (ASE, Amplified spontaneous emission) generada al principio en el oscilador y además permite aumentar bastante la potencia de salida del láser. La energía máxima por pulso obtenida con el láser de colorante es de unos 40 mJ en el máximo de emisión de la Rodamina.

Para obtener la luz ultravioleta necesaria para

llevar a cabo los experimentos LDI/MALDI de este estudio el haz que sale del colorante se dobla en un cristal KDP. De esta manera, del intervalo de emisión útil de la rodamina 6G (540-590 nm) hemos trabajado con longitudes de onda fijas comprendidas entre 270 y 295 nm, siendo el valor máximo de energía que se obtiene tras el proceso de doblado de 7 mJ/pulso para radiación de 280 nm.

### 2.2.3. Láser infrarrojo sintonizable OPO/OPA

El sistema experimental también cuenta con un oscilador óptico paramétrico (OPO, del inglés *optical parametric oscillator* de Laser Vision) sintonizable en el infrarrojo.

Un OPO, que no es exactamente un láser, utiliza la respuesta no lineal de un medio (generalmente un cristal) a un campo conductor (el láser de bombeo) para convertir fotones de una longitud de onda dada en otros de longitud de onda mayor. En concreto, el medio no lineal convierte cada fotón altamente energético del láser de bombeo en dos fotones de menor energía, uno más fuerte y otro más débil (*signal wave* e *idler wave*, respectivamente). Las longitudes de onda exactas de los fotones generados dependen del ángulo de incidencia de los fotones del láser de bombeo con respecto al eje del cristal que actúa como medio no lineal. La energía se transmite eficientemente a las ondas paramétricas si los tres paquetes de ondas que intervienen en el proceso están en fase. En la mayoría de los casos, la variación del índice de refracción con el ángulo del cristal y la longitud de onda, permite que esta condición de “ajuste de fase” se produzca únicamente para: un solo intervalo de longitudes de onda, un ángulo dado de incidencia en el cristal y una longitud de onda de bombeo. Así se producirá radiación de diferente frecuencia al rotar el cristal donde ocurre el proceso.

El sistema cuenta con un amplificador óptico paramétrico (OPA, del inglés *optical parametric amplifier*) para amplificar el haz generado por el OPO. La ventaja de los OPA consiste en que alimentándolos, bien con la onda de menor energía, bien con la de energía mayor, se consigue amplificar radiación no sólo de esa longitud de onda, sino también de la otra. Y además, bombeando el

Tabla 2.2: Intervalo de emisión del sistema OPO/OPA.

| BOMBEO  | Intervalo de emisión              | Polarización |
|---------|-----------------------------------|--------------|
| 532 nm  | 710–880 nm (signal)               | horizontal   |
| 532 nm  | 2,128–1,35 $\mu\text{m}$ (idler)  | vertical     |
| 1064 nm | 2,128–1,35 $\mu\text{m}$ (signal) | horizontal   |
| 1064 nm | 2,128–5 $\mu\text{m}$ (idler)     | vertical     |

OPA con una frecuencia distinta de la que bombea el OPO, se extiende el intervalo de longitudes de onda que se generan en el oscilador. De este modo, variando las configuraciones del OPA se puede obtener radiación en un amplio intervalo de longitudes de onda.

En nuestro caso, el sistema OPO/OPA puede emitir radiación en el intervalo comprendido entre 1.35 y 5  $\mu\text{m}$ , con un ancho de banda de  $\approx 1.7 \text{ cm}^{-1}$  (al utilizar el *seeder*, o inyección sembrada) y de  $\approx 3.5 \text{ cm}^{-1}$  (cuando no se utiliza el *seeder*). El sistema está bombeado por un láser de Nd:YAG (Surelite II, Laser Vision) empleándose su frecuencia fundamental (1064 nm) o el segundo armónico (532 nm) para obtener radiación en el intervalo de longitudes de onda que se requiera en cada caso, tal y como puede observarse en la tabla 2.2.

En los experimentos realizados en este estudio se ha utilizado radiación láser infrarroja de 3  $\mu\text{m}$  con energías por pulso que oscilan entre 0.5 y 3 mJ, aplicando una energía de bombeo de entre 500 y 550 mJ por pulso de 1064 nm. El equipo dispara con una frecuencia de repetición de 10 Hz.

## 2.3. Métodos de preparación de muestras

Entre la gran variedad de métodos y protocolos que se han desarrollado para la preparación de muestras en análisis LDI/MALDI, es el método de coprecipitación (*air dried-droplet*) el que tradicionalmente ha sido más utilizado [2] (así como algunas de sus variantes como la deposición en capas

finas (*thin-layer*) [3] o las preparaciones en sándwich [4, 5]). También destacan otros métodos relativamente más recientes como el método de preparación de muestras libres de disolvente (*solvent-free*) [6] y el uso de matrices MALDI líquidas [7].

En los experimentos LDI/MALDI descritos en esta tesis se han utilizado estos tres métodos para estudiar los fenómenos de agregación supramolecular en fase gaseosa de triazinas, hidrocarburos poliaromáticos y asfaltenos. Resulta por tanto conveniente abordar los detalles más relevantes del proceso de optimización de la preparación de muestras en cada caso, así como las ventajas y desventajas que presentan en su aplicación potencial al análisis de sustancias diversas.

### 2.3.1. Matrices MALDI

En un proceso MALDI típico la molécula matriz absorbe la energía del láser, experimentando un notable incremento de su energía interna y provocando reacciones de transferencia de energía y carga que resultan en la desorción e ionización de los analitos de interés diluidos en su seno. La proporción molar matriz:analito que se ha empleado en este estudio es muy variable (1:1 – 2000:1) ya que depende en cada caso concreto de la naturaleza de la matriz y la sustancia que estemos analizando, así como de la finalidad del experimento en cuestión.

Para la realización de este trabajo se han empleado como matrices MALDI los ácidos 2,4 y 2,5 dihidroxibenzoico (2,4 / 2,5 DHB), el ácido 4-alfacianohidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA) y el 1,8,9-antraceno-9-ol (ditanol). La figura 2.13 muestra el espectro de absorbancia ultravioleta de estas matrices. Esta figura, junto con la información de la tabla 2.3, en la que se detalla el peso molecular de las matrices así como su fórmula y su absorptividad molar para las longitudes de onda de interés (266–355 nm), proporcionan el punto de partida para justificar el empleo de una u otra matriz, en función del analito que se va a estudiar y de la configuración láser empleada.

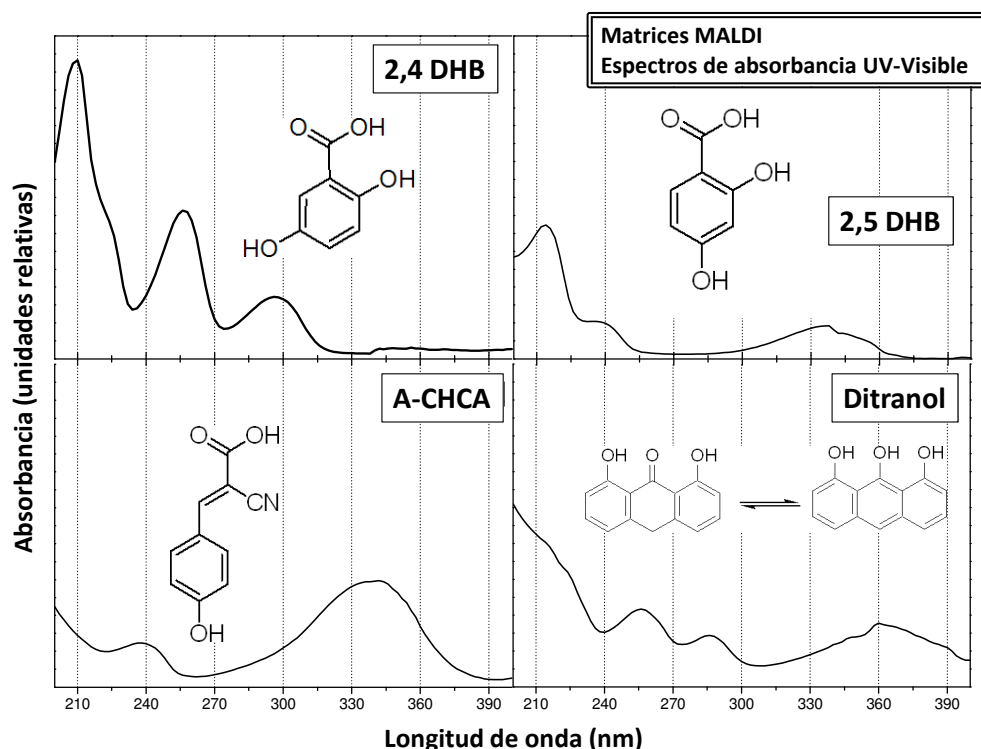


Figura 2.13: **Espectros de absorbancia ultravioleta-visible de las matrices empleadas en este estudio:** 2,4 y 2,5 DHB,  $\alpha$ -CHCA y ditranol. En cada panel se incluye la estructura molecular de la matriz. Los espectros se han registrado con un espectrofotómetro de fibra óptica CCD (DH2000, Ocean Optics).

### 2.3.2. Método de coprecipitación (*air dried-droplet*)

El método de coprecipitación (*dried-droplet*) es el más extendido en MALDI y fue introducido por Hillenkamp y Karas [2], pioneros de la técnica. El método consiste en mezclar pequeños volúmenes de disoluciones de matriz y de analito, y depositar una pequeña cantidad sobre la superficie del portamuestras, dejando evaporar el disolvente. Así se obtiene una deposición sólida de la mezcla matriz-analito en el portamuestras, sobre la cual se hará incidir el láser. Aunque inicialmente se pensó que era crucial una cristalización conjunta de matriz y analito para obtener señales MALDI intensas, hoy se sabe que este no es necesariamente el caso, y así lo prueba el método de preparación de muestras libre de disolvente descrito más abajo.

De forma general, la apariencia y homogeneidad de las muestras una vez depositadas varía en función del tipo de matriz, de la proporción analito/matriz, del pH y del disolvente empleado. Un fenómeno que se observa frecuentemente en los experimentos LDI/MALDI en muestras preparadas con este método es una fuerte variación en la intensidad y resolución de las señales obtenidas al enfocar el haz láser en diferentes puntos de la muestra [8]. Es lo que se denomina “hot spot” o “sweet spot” y está relacionado con la distribución irregular del analito en el seno de la matriz, o con la distribución irregular del analito en la superficie del portamuestras al evaporarse el disolvente, dando lugar en la superficie de la muestra a zonas en las que la densidad de analito es altamente variable. El principal problema derivado de este fenómeno es la pobre reproducibilidad disparo a disparo y las diferencias observadas al enfocar el láser en puntos distintos de la muestra, lo que constituye uno de

Tabla 2.3: Denominación, fórmula, peso molecular y absorptividad molar de las matrices MALDI empleadas.

| MATRIZ   | Fórmula   | Peso molecular<br>(g/mol) | Absorptividad molar<br>(M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) |
|----------|---|---------------------------|--|
| 2,4 DHB  | (HO) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H | 154,12                    | 20432 (λ=266nm)<br>23024 (λ=300nm)                         |
| 2,5 DHB  | (HO) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H | 154,12                    | 2962 (λ=300nm)   |
| α-CHCA   | HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH=C(CN)CO <sub>2</sub> H         | 189,17                    | 8560 (λ=300nm)<br>16590 (λ=355nm)                          |
| Ditranol | C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>                    | 226,23                    | 6425 (λ=285nm)<br>6719 (λ=355nm)                           |

los mayores impedimentos para la aplicación de la técnica MALDI a análisis cuantitativos.

Otro inconveniente que presenta este método radica en la necesidad de que tanto la matriz como el/los analito/s y los agentes cationizantes en su caso, tienen que ser solubles en el mismo disolvente, o bien en disolventes miscibles. Y no solamente eso, sino que además la solubilidad de las especies que forman parte de la muestra debe de ser similar en el disolvente en cuestión, ya que de otro modo, se estarán favoreciendo determinadas interacciones en el seno del líquido en detrimento de otras, o se estará favoreciendo la presencia masiva de una especie frente a otra en la pluma de desorción. Estas consideraciones hacen muy difícil por ejemplo, el análisis MALDI de compuestos con marcado carácter hidrofóbico a los que se quiera añadir una sal como agente cationizante. Como se verá más adelante, el método de preparación de muestras libres de disolvente soluciona este problema, haciendo posible por ejemplo la caracterización mediante LDI/MALDI de compuestos pesados derivados del carbono altamente insolubles incluso en disolventes agresivos.

En nuestro caso, las muestras preparadas mediante el método *dried-droplet* se elaboraron a partir de disoluciones stock de los analitos de interés y en su caso, de los compuestos empleados como matrices. Los disolventes empleados varían según la naturaleza de los analitos estudiados, siendo metanol en el caso de las triazinas y tolueno en el caso de los hidrocarburos poliaromáticos y asfaltenos. El volumen de muestra depositado en el portamuestras oscila entre 20 y 30 μl, entendiendo como muestra la propia disolución stock en el caso de los análisis LDI y una mezcla previa en la proporción molar correspondiente de las disoluciones

de matriz y analito en el caso de los experimentos MALDI.

### 2.3.3. Preparación de muestras libres de disolvente (*solvent-free*)

El método de preparación de muestras libres de disolvente (*solvent-free*) para análisis MALDI se desarrolló principalmente con el fin de aplicar la técnica a polímeros poco solubles de elevado peso molecular [6]. El método permite trabajar con sustancias puras (si son buenos cromóforos) o con combinaciones analito/matriz sin restricciones en su polaridad, lo que amplía el campo de aplicación de la técnica LDI/MALDI considerablemente [9–12].

Para preparar la muestra basta con machacar en un mortero la sustancia de interés, o la mezcla analito/matriz, hasta obtener un polvo fino. Una pequeña cantidad de la muestra se coloca en la superficie del portamuestras con la ayuda de una espátula. Es recomendable exponer la superficie del portamuestras a una corriente de aire para eliminar las partículas débilmente adheridas a la superficie, evitando así la contaminación de la fuente de iones. Se puede utilizar un molinillo de bolas [13] en lugar de un mortero para obtener un grano más fino de muestra. No obstante, y de acuerdo con la experiencia en nuestro grupo, esto no tiene demasiada influencia en el resultado de los análisis MALDI.

El éxito del método *solvent-free* ha supuesto una importante revisión de los conceptos establecidos sobre los mecanismos de desorción/ionización que se producen en MALDI [14]. Hasta hace no

muchos años se asumía que en MALDI era imprescindible la formación de cristales de matriz, en los que el analito quedaba embebido, para que la matriz pudiera asistir de forma eficiente el proceso de desorción del analito. Sin embargo, el método *solvent-free* pone de manifiesto que la cocristalización matriz-analito no es necesaria y que los efectos que tienen lugar en la pluma son lo suficientemente eficientes como para producir la ionización de las moléculas de analito [15]. De hecho, este método resulta especialmente adecuado para estudiar las interacciones supramoleculares que ocurren en fase gaseosa durante el proceso de desorción.

En el contexto de esta investigación se ha puesto a punto con éxito el método de preparación de muestras libres de disolvente para el análisis de compuestos derivados del carbono de diversa complejidad. Tanto los hidrocarburos poliaromáticos como los asfaltenos presentan una solubilidad muy baja o prácticamente nula en los disolventes polares adecuados para disolver las matrices y las sales necesarias para la realización de los experimentos. Mediante este método nos ha sido posible por tanto la mezcla de sustancias de diversa polaridad facilitando tremendamente el proceso de preparación de muestras.

Desde el punto de vista cualitativo no encontramos diferencias dignas de mención entre los espectros LDI/MALDI de muestras preparadas mediante *solvent-free* o *dried-droplet*, siempre que haya una densidad promedio alta del analito en el portamuestras o un factor de dilución adecuado matriz/analito, respectivamente.

La figura 2.14 muestra espectros MALDI del coroneno (uno de los hidrocarburos poliaromáticos analizados en este estudio) obtenidos con radiación láser de 266 nm y utilizando como matriz el ditranol. En primer lugar puede observarse que no existen diferencias significativas entre los espectros MALDI coroneno/ditranol obtenidos a partir de muestras preparadas mediante el método *solvent-free* y *dried droplet* en las mismas condiciones experimentales (energías por pulso láser de 20  $\mu\text{J}$  y factor de dilución molar analito/matriz 1:500).

La ausencia de agregados en el espectro MALDI de la mezcla coroneno/ditranol preparada mediante la técnica *solvent-free* es particularmente re-

levante. Teniendo en cuenta que en experimentos LDI, empleando la fuente pulsada y energías por pulso láser de 30  $\mu\text{J}$ , se generan agregados de hasta 5 unidades, (ver figura 2.10), en este caso, incluso aplicando energías de 40  $\mu\text{J}$ /pulso y superiores (espectros no mostrados) no se produce agregación del analito, a pesar de que el incremento de energía conlleva la transferencia a la fase gaseosa de una mayor cantidad de material, y por consiguiente, la formación de agregados en tales condiciones debería ser un proceso más eficiente.

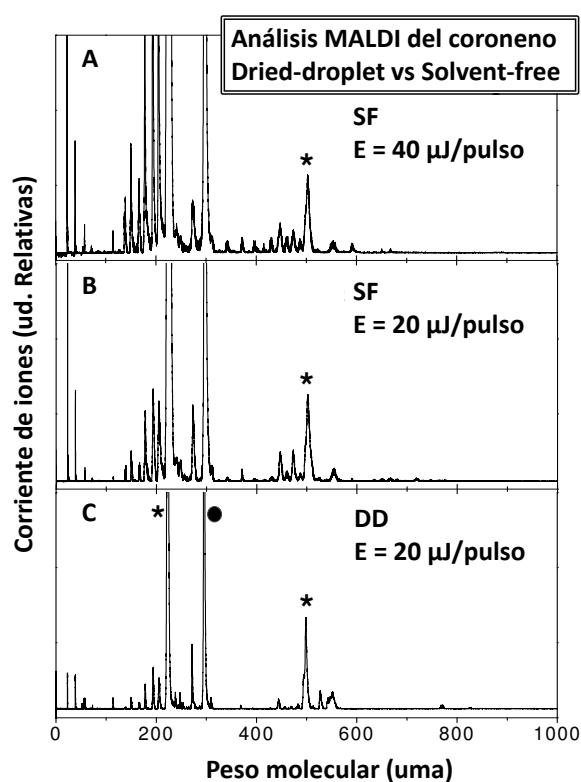


Figura 2.14: Espectros MALDI del coroneno medidos en muestras preparadas mediante *solvent-free* (paneles A y B) y *dried-droplet* (panel C). En todos los casos se utiliza ditranol como matriz, siendo la proporción molar analito/matriz de 1:500. La energía por pulso láser de 266 nm empleada se indica en cada caso. El pico correspondiente al coroneno (peso molecular: 300.36 uma) se indica con un punto negro, mientras que los correspondientes a la matriz y su dímero se denotan con un asterisco. En ningún caso se observan agregados del coroneno. Todos los espectros se registraron en condiciones de extracción pulsada de iones.



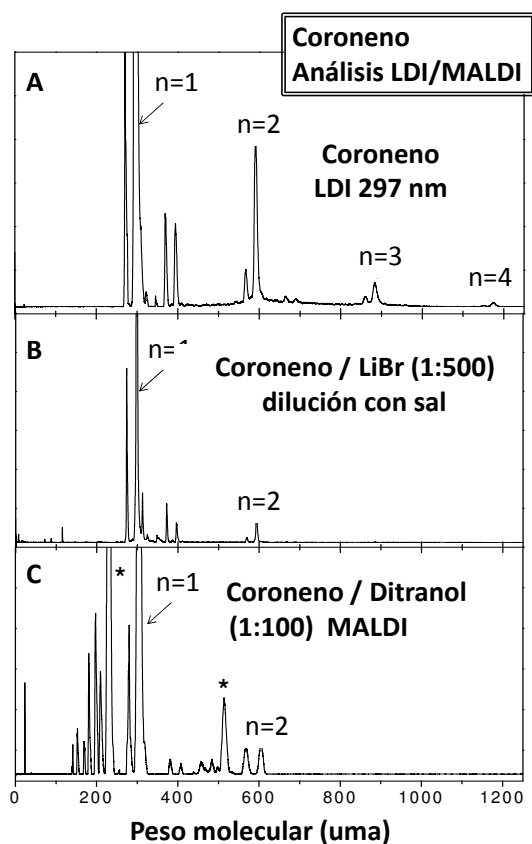


Figura 2.15: Espectros LDI/MALDI del coroneno en estado puro y diluido con una sal (LiBr) y la matriz ditranol. Espectros LDI/MALDI medidos a 297 nm en muestras preparadas mediante *solvent-free*. El panel A muestra el espectro de masas correspondiente al coroneno en estado puro, y los paneles B y C muestran el espectro que resulta de la dilución del coroneno con una sal (LiBr) y la matriz ditranol, respectivamente. La relación molar entre los componentes de la muestra se indica en cada panel. La energía láser empleada es de  $20\mu\text{J}$ /pulso en todos los casos. En los espectros de las muestras diluidas de coroneno (B y C) se observa una reducción del número de *clusters*. Al diluir con la sal (B) todas las señales que se obtienen en el espectro corresponden al coroneno, mientras que al diluir con la matriz MALDI (C) se observan picos adicionales en el espectro asociados a la matriz (\*), su dímero (\*) y sus fragmentos. Todos los espectros se realizaron en condiciones de extracción pulsada de iones.

Los resultados obtenidos implican que el material desorbido a partir de la muestra microgranulada resultante del método *solvent-free* se disgrega eficientemente en monómeros en el proceso

de desorción láser, para finalmente reagregar en la pluma siempre que se alcance una densidad suficiente del analito. Este resultado no es necesariamente el esperado, ya que a priori el desprendimiento directo de *clusters* desde las micropartículas producidas mediante esta técnica de preparación de muestras constituye un proceso factible [1].

De igual manera, hemos comprobado que el proceso de agregación puede suprimirse en experimentos LDI mediante la dilución del analito con sustancias de diferente naturaleza. Por ejemplo, la figura 2.15 muestra el espectro LDI de coroneno, medido a 266 nm (A), tras ser diluido con una sal (B) y con la matriz ditranol (C). Todos los espectros se han obtenido empleando energías de  $20\mu\text{J}$ /pulso.

El empleo de la sal para disminuir o suprimir la agregación de especies en la pluma de desorción es especialmente apropiado para la detección del monómero de sustancias ligeras ( $<500\text{ uma}$ ) ya que se elimina la intensa señal que se observa a masas bajas fruto de la fragmentación de la matriz durante el proceso (C) al emplear la técnica MALDI.

#### 2.3.4. Uso de líquidos iónicos como matrices MALDI

Los líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTIL, del inglés *room temperature ionic liquid*) son el centro de numerosas investigaciones científicas recientes con finalidades muy diversas [16]. Se ha estudiado su utilización como nuevos disolventes para la síntesis orgánica, la extracción líquido-líquido, en estudios electroquímicos y, lo más relevante para esta tesis, como matrices líquidas en los procesos de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS) [17]. Los RTIL son sales orgánicas que se caracterizan por tener temperaturas de fusión por debajo de la temperatura ambiente, poseer una presión de vapor extremadamente pequeña, no ser explosivos ni inflamables y permanecer estables a temperaturas por debajo de  $250^\circ\text{C}$  [18].

Las propiedades de los líquidos iónicos pueden ser muy variadas y están directamente relacionadas con los cationes y aniones que los forman. Fre-

cuentemente se usan como cationes derivados de la piridina o el imidazolio, compuestos con amonio y aniones orgánicos e inorgánicos como el nitrato, tetrafluoroborato, tosilato, y triflato. Puesto que innumerables combinaciones son posibles, los líquidos iónicos son buenos compuestos para probar y diseñar disolventes con diferentes densidades, viscosidades, puntos de fusión, polaridad y miscibilidad en agua. El uso de matrices líquidas en MALDI conlleva una homogeneidad de la muestra incontestable para los métodos basados en muestras sólidas.

Podemos distinguir tres tipos de matrices líquidas. El primer grupo comprende compuestos que se utilizan análogamente a las matrices sólidas, y que son capaces de absorber la radiación del láser permitiendo la desorción e ionización de los analitos [19]. El segundo grupo lo constituyen matrices dopadas con partículas de metal o grafito suspendidas en disolventes no volátiles que no absorben en la región del UV pero que juegan un papel importante en los procesos de protonación o desprotonación del analito. Buenos ejemplos son los sistemas de grafito-glicerol [20] o la combinación de nanomateriales con glicerol [21]. La tercera clase comprende los líquidos químicamente dopados. Las matrices cristalinas clásicas son buenos representantes de esta clase de matrices, una vez disueltas en glicerol [22].

A continuación se resumen los principales aspectos relacionados con la introducción del uso de líquidos iónicos como matrices MALDI en nuestro laboratorio, prestando especial atención a la síntesis de los RTIL y a la calidad de los espectros resultantes del análisis MALDI. Estos estudios preliminares han sido fundamentales para la posterior aplicación de uno de ellos a la detección de asfaltenos, lo cual es objeto del capítulo 6 de esta memoria, y constituye una aplicación novedosa de este tipo de matrices al emplearlas para el estudio de sistemas complejos derivadas del carbono.

### Síntesis de RTILs y preparación de muestras

La síntesis de RTILs es relativamente sencilla y puede llevarse a cabo básicamente de dos formas. La primera consiste en la mezcla de una disolución del componente ácido con la base orgánica

en metanol, seguido por una fase de mezclado mediante ultrasonidos y la total eliminación del disolvente [7]. Otra alternativa es la combinación de soluciones stock del ácido y la base disueltas en acetonitrilo. La mezcla resultante se utiliza directamente para la preparación de la muestra [23]. Este método tiene el peligro de que un exceso de uno de los dos componentes puede dar lugar a la contaminación del sistema de vacío (exceso de base) o bien a la cristalización parcial de la muestra (exceso de ácido).

En el caso que nos ocupa se han probado ambas opciones, si bien se han obtenido mejores resultados al disolver conjuntamente cantidades equimolares del ácido y la base en pequeños volúmenes de metanol o acetonitrilo para favorecer la interacción de los componentes, por una fase de mezclado mediante ultrasonidos y la eliminación del disolvente. Una vez que el líquido iónico se va a mezclar con el analito de interés, pueden añadirse proporciones variables de metanol o acetonitrilo para facilitar la incorporación del analito en el seno del líquido iónico, depositar un pequeño volumen sobre el portamuestras, y esperar a la completa evaporación del disolvente. En general, los líquidos iónicos empleados como matrices MALDI forman capas viscosas sobre el portamuestras, lo cual previene la caída de la muestra de los soportes dispuestos verticalmente (como en nuestro caso).

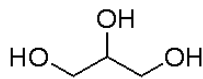
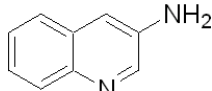
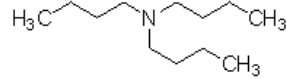
|   |   |
|---|---|
| <p><b>Glicerol</b><br/>OHCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>(OH)</p>  <p>Peso molecular (g/mol): 92,09</p>     | <p><b>Butilamina</b> CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub></p> <p>CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub></p> <p>Peso molecular (g/mol): 73,13</p>                  |
| <p><b>3-aminoquinolina</b> C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub></p>  <p>Peso molecular (g/mol): 144,17</p> | <p><b>Tributilamina</b><br/>[CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>3</sub>N</p>  <p>Peso molecular (g/mol): 185,35</p> |

Figura 2.16: Denominación, fórmula, peso molecular y estructura del glicerol y las bases empleadas en la síntesis de líquidos iónicos: butilamina, tributilamina y 3-aminoquinolina.

En el presente estudio se han sintetizado líquidos iónicos a partir de matrices MALDI utilizadas habitualmente, combinadas con distintas bases cuya denominación, fórmula, peso molecular y estructura se detalla en la figura 2.16. Concretamente se han sintetizado líquidos iónicos a partir de los ácidos 2,4 DHB, 2,5 DHB y  $\alpha$ -CHCA mezclados en proporción equimolar con bases como la butilamina, tributilamina o 3-aminoquinolina. También se ha sintetizado una matriz líquida con glicerol, a partir de la mezcla de glicerol/ $\alpha$ -CHCA/3-aminoquinolina en proporción 1:4:6 en peso introducida por Sze y colaboradores [22] y empleada con éxito en el análisis de aminoácidos, péptidos y proteínas [24]. La figura 2.17 muestra el espectro de absorción ultravioleta de los líquidos iónicos sintetizados con éxito en nuestro laboratorio.

De forma general para los análisis MALDI se añaden entre 3 y 5  $\mu$ L de la disolución de analito a 20  $\mu$ L de líquido iónico puro, alcanzándose una proporción en volumen analito/matriz 1:6 o 1:4. En ocasiones se añaden pequeñas cantidades (5-10  $\mu$ L) de acetonitrilo o metanol para favorecer la solubilidad de determinados compuestos. Se depositan 10  $\mu$ L de la mezcla en la superficie del portamuestras y una vez que se evapora todo el disolvente la muestra está preparada para ser analizada.

La figura 2.18 muestra una fotografía de muestras preparadas con los distintos métodos de preparación de muestras descritos en esta sección: *dried-droplet*, *solvent-free* y empleando un RTIL como matriz. Puede observarse a simple vista y de forma clara la mayor homogeneidad de las muestras preparadas con líquidos iónicos. Los experimentos realizados en nuestro laboratorio coinciden con los realizados por otros grupos al concluir que la reproducibilidad disparo a disparo de la señal MALDI es un orden de magnitud mayor al emplear matrices RTIL en lugar de matrices sólidas convencionales [23–25].

Otro aspecto a señalar es que se puede realizar un número de disparos considerablemente mayor en un mismo punto de la muestra que si utilizamos matrices sólidas, debido a la recuperación de la superficie tras cada disparo láser. Esta mejora en la duración de la muestra es beneficiosa para análisis en los que son imprescindibles un alto número de

disparos, como es el caso de análisis fragmentativos de tipo *post source decay* (PSD).

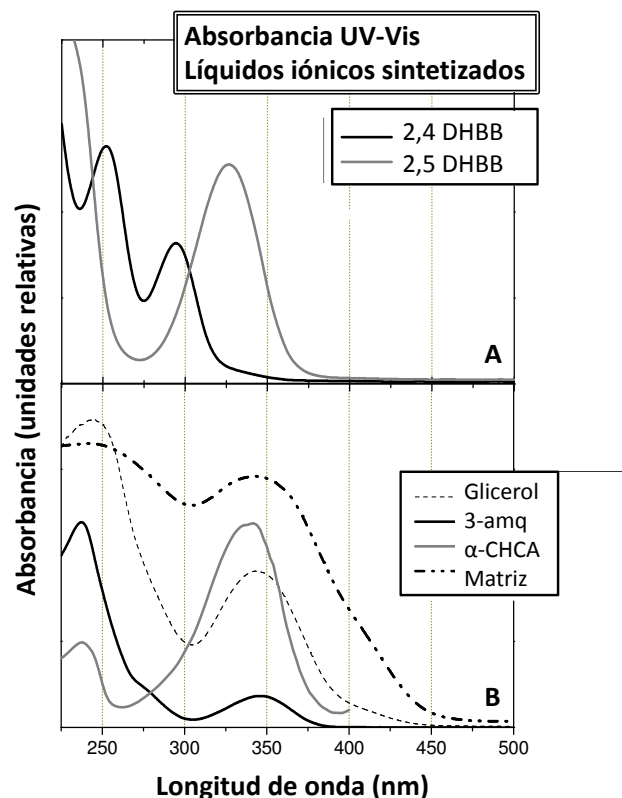


Figura 2.17: Espectro de absorción ultravioleta-visible de los líquidos iónicos sintetizados. A) Líquidos iónicos constituidos por 2,4 y 2,5 DHB y butilamina (2,4 y 2,5 DHBB, respectivamente). Su absorbancia es muy similar a la de los ácidos que contienen. (Igual ocurre con el líquido iónico obtenido a partir del  $\alpha$ -CHCA con butilamina (no mostrado)). B) Líquido iónico constituido por  $\alpha$ -CHCA, glicerol y 3-aminoquinolina. Su espectro de absorbancia es el resultado de la combinación de la absorbancia de sus componentes. Es adecuado para trabajar en parte de la región visible del espectro y en el ultravioleta cercano.

Todas estas propiedades, que se han contrastado empíricamente en nuestro laboratorio, hacen de los RTIL unos buenos candidatos para estudiar el proceso de ionización de diferentes analitos o para el análisis MALDI cuantitativo [23]. No hemos dedicado esfuerzos a realizar análisis cuantitativos de forma sistemática en nuestro laboratorio, si bien es

uno de los objetivos de futuros estudios dentro de esta línea de investigación.

En general la resolución en masas de los espectros obtenidos al utilizar líquidos iónicos como matrices MALDI disminuye o es similar en los mejores casos a las obtenidas al trabajar con métodos tradicionales. En nuestro caso, los valores de sensibilidad (límite de detección) y de resolución en masas alcanzados varían de forma notable en función de la combinación analito-matriz, aspecto corroborado por las referencias consultadas. Se puede inferir que la composición del RTIL puede tener una gran influencia en la eficiencia MALDI de un analito en particular [26–28].

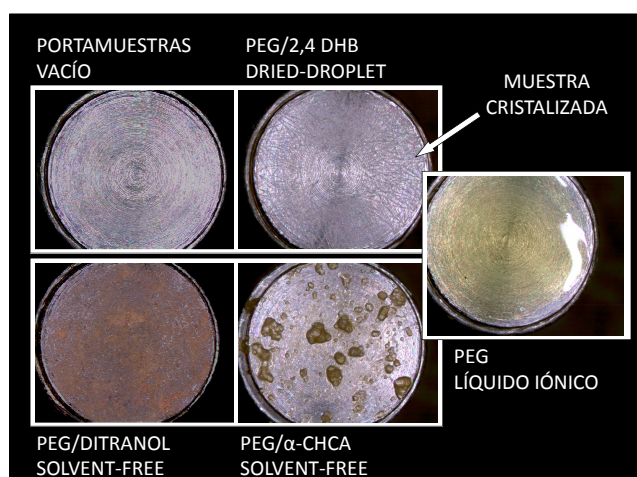


Figura 2.18: Fotografías de muestras preparadas mediante los tres métodos de preparación de muestras utilizados en los experimentos LDI/MALDI: *dried-droplet*, *solvent-free* y uso de líquidos iónicos como matrices. Puede observarse la mayor homogeneidad de la muestra preparada con el líquido iónico, así como la presencia de cristales en la muestra preparada con el método *dried-droplet* y el aspecto granuloso de las preparadas con el método *solvent-free*.

La matriz constituida por glicerol,  $\alpha$ -CHCA y 3-Aminoquinolina parece ser especialmente adecuada para el análisis de péptidos, así como para compuestos de pequeño peso molecular ( $<500$ uma), debido a la supresión de la señal de matriz a masas bajas que se obtiene.

La figura 2.19 muestra tres espectros MALDI de muestras de angiotensina I —una proteína—

diluida con  $\text{CuSO}_4$ , preparadas mediante los tres métodos descritos anteriormente: a) *dried-droplet*, b) *solvent-free* y c) empleando un líquido iónico como matriz.

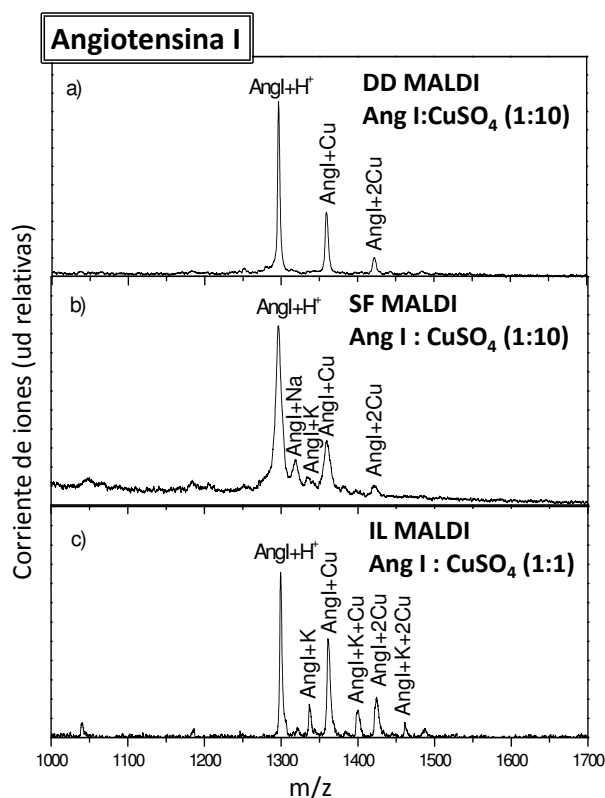


Figura 2.19: Espectros MALDI de muestras de angiotensina I y  $\text{CuSO}_4$  preparadas mediante *dried-droplet*, *solvent-free* y empleando líquidos iónicos como matrices MALDI. Proporción molar angiotensina I :  $\text{CuSO}_4$  1:10. a) método de coprecipitación (DD), matriz:  $\alpha$ CHCA, energía por pulso láser de 355 nm de 30  $\mu\text{J}$ ; b) muestra libre de disolvente (SF), matriz:  $\alpha$ CHCA, energía por pulso láser de 355 nm de 35  $\mu\text{J}$ ; c) matriz: el líquido iónico  $\alpha$ CHCA/3-aminoquinolina/glicerol, energía por pulso láser de 355 nm de 25  $\mu\text{J}$  (en este caso la proporción molar angiotensina I :  $\text{CuSO}_4$  es 1:1).

Los espectros de la figura ponen de manifiesto:

1. el buen funcionamiento del líquido iónico como matriz (panel c), puesto que hace posible la desorción e ionización del analito, obteniéndose espectros de masas similares a los registrados empleando la matriz convencional ( $\alpha$ CHCA (paneles a y b));

2. que la resolución en masas en el intervalo considerado es similar a la obtenida empleando el método tradicional de coprecipitación;

3. la mayor disponibilidad de cationes (y aniones) en el seno del líquido iónico, lo que posibilita la cationización eficaz del analito, incluso por los cationes presentes en la muestra como impurezas (el

potasio en este caso, ver panel c).

4. que la sensibilidad de la matriz constituida por el líquido iónico es ligeramente inferior, ya que se requiere un factor de dilución menor del analito para obtener espectros de calidad similar a los obtenidos con métodos tradicionales.



---

## Bibliografía

---

- [1] B. Martínez Haya, A.R. Hortal, P. Hurtado, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa. *Laser desorption/ionization determination of molecular weight distributions of polyaromatic carbonaceous compounds and their aggregates*. Journal of Mass Spectrometry 42 (6):701-713 (2007)
- [2] M. Karas, F. Hillenkamp. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons*. Analytical Chemistry 60 (20): 2299-2301 (1988)
- [3] O. Vorm, P. Roepsorff, M. Mann. *Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation*. Analytical Chemistry 66 (19): 3281-3287 (1994)
- [4] Kussmann et al. *Matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes*. Journal of Mass Spectrometry 32 (6): 593-601 (1997)
- [5] R.M. Dai, L.Li. Whittall, *Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures*. Analytical Chemistry 71 (5): 1087-1091 (1999)
- [6] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H.J. Räder, K. Müllen. *New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 15 (15): 1364-1373 (2001)
- [7] D.W. Armstrong, L.K. Zhang, L. He, M.L. Gross. *Ionic Liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry 73 (15): 3679-3686 (2001)
- [8] R.W. Garden, J.V. Sweedler. *Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging*. Analytical Chemistry 72 (1): 30-36 (2000)
- [9] W.F. Edwards, L. Jin, M.C. Thies. *MALDI-TOF mass spectrometry: obtaining reliable mass spectra for insoluble carbonaceous pitches*. Carbon 41 (14): 2761-2768 (2003)
- [10] S. Trimpin, S. Deune, H.J. Räder, K. Müllen. *Solvent-free MALDI-MS: developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules*. Journal American Society for Mass Spectrometry 17 (5): 661-671 (2006)
- [11] A.R. Dolan, T.D. Wood. *Analysis of polyaniline oligomers by laser desorption ionization and solventless MALDI*. Journal of American Society for Mass Spectrometry 15 (6): 893-899 (2004)
- [12] K. Yoshimura et al. *Characterization of large sythetic polycyclic aromatic hydrocarbons by MALDI and LD-TOF mass spectrometry*. Macromolecular Chemical Physics 202 (2): 215-222 (2001)
- [13] S.D. Hanton, D.M. Parees. *Extending the solvent-free MALDI sample preparation method*. Journal of American Society for Mass Spectrometry 16 (1): 90-93 (2005)

- [14] S. Trimpin, H.J. Räder, K. Müllen. *Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation. Part I. Preorganization.* International Journal of Mass Spectrometry 253 (1-2): 13-21 (2006)
- [15] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat. *Is the incorporation of analytes into matrix crystal a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid.* International Journal of Mass Spectrometry 185/186/187: 859-870 (1999)
- [16] J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong. *Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions.* Journal of the American Chemical Society 124 (47): 14247-14254 (2002)
- [17] A. Tholey, E. Heinzle. *Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry -applications and perspectives.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 386 (1): 24-37 (2006)
- [18] P. Wasserscheid, W. Keim. *Ionic liquids: new solutions for transition metal catalysis.* Angewandte Chemie-International Edition 39 (21): 3773-3789 (2000)
- [19] S. Zhao, K.V. Somayajula, A.G. Sharkey, D.M. Hercules, F. Hillenkamp, M. Karas, A. Ingendoh. *Novel method for matrix-assisted laser mass spectrometry of proteins.* Analytical Chemistry 63 (5): 450-453 (1991)
- [20] M.J. Dale, R. Knochenmuss, R. Zenobi. *Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry.* Analytical Chemistry 68 (19): 3321-3329 (1996)
- [21] M. Schürenberg, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp. *Laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins with particle suspension matrices.* Analytical Chemistry 71 (1): 221-229 (1999)
- [22] E.T.P. Sze, T-W.D. Chan, G. Wang. *Formulation of matrix solutions for use in matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry 9 (2): 166-174 (1998)
- [23] M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, A. Tholey. *Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices.* Rapid Communications in Mass Spectrometry 18 (2): 141-148 (2004)
- [24] M. Zabet-Moghaddam, R. Krüger, E. Heinzle, A. Tholey. *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the characterization of ionic liquids and the analysis of amino acids, peptides and proteins.* Journal of Mass Spectrometry 39 (12): 1494-1505 (2004)
- [25] M. Mank, B. Stahl, G. Boehm. *2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrices for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules.* Analytical Chemistry 76 (10): 2938-2950 (2004)
- [26] S. Carda-Broch, A. Brthod, D.W. Armstrong. *Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers.* Rapid Communications in Mass Spectrometry 17 (6): 553-560 (2003)
- [27] A. Tholey. *Ionic liquid matrix with phosphoric acid as matrix additive for the facilitated analysis of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (11): 1761-1768 (2006)
- [28] A. Tholey, M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle. *Quantification of peptides for the monitoring of protease-catalyzed reactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices.* Analytical Chemistry 78 (1): 291-297 (2006)



## CAPÍTULO 3

---

### Procesos fragmentativos y de agregación en fase gaseosa en análisis LDI/MALDI de triazinas

---

Este capítulo aborda los procesos de fragmentación y agregación supramolecular inducidos durante la desorción/ionización láser (LDI) de cuatro clorodiaminotriazinas –simazina, atrazina, terbutilazina y propazina– y dos metilmercaptotriazinas –ametrina y terbutrina–. Los dos tipos de triazinas considerados en el estudio difieren en el comportamiento que experimentan en nuestras condiciones de trabajo debido fundamentalmente a la estabilidad que proporciona a la molécula el sustituyente que ocupa la posición 2 del anillo triazínico, siendo más estables aquellas que poseen un grupo metil-tio, frente a las que poseen un átomo de cloro. Debido a ello la radiación láser de 266 nm, que solapa con la primera banda de absorción ultravioleta de las especies estudiadas, induce rutas fragmentativas distintas en cada grupo, que también redundan en la formación de agregados supramoleculares característicos en cada caso. Las clorodiaminotriazinas pierden en primer lugar el átomo de cloro, seguido de la fragmentación parcial o total de las cadenas hidrocarbonadas laterales. Las metilmercaptotriazinas presentan un canal de fragmentación en el que la desalquilación parcial y/o total de tales cadenas ocurre de forma preferente, manteniéndose intacto el grupo SCH<sub>3</sub>. La desaminación no se observa en ningún caso a diferencia de la ruptura del anillo triazínico, que se produce eficientemente al aplicar potencias láser moderadas. En cuanto a los procesos de agregación supramolecular que tienen lugar eminentemente en fase gaseosa en la pluma de desorción, las clorotriazinas forman complejos de naturaleza covalente y no covalente de forma eficiente, detectándose agregados de hasta siete unidades de forma clara, y siendo aquellos que contienen el fragmento declorado los que presentan una señal más intensa. Las metilmercaptotriazinas forman complejos de hasta cuatro unidades constituidos por una mayor variedad de fragmentos. Tanto la fragmentación como la agregación se suprimen significativamente bajo condiciones MALDI.



### 3.1. Introducción

Las triazinas constituyen una familia de herbicidas de uso generalizado debido a su bajo coste y a la gran variedad de cultivos a los que son aplicables. Sin embargo, muchos de estos compuestos constituyen una amenaza para el medio ambiente ya que son muy persistentes y tienden a acumularse en los suelos para finalmente incorporarse a las aguas subterráneas o fluviales [1]. Si bien son levemente tóxicos para el ser humano y no suponen un riesgo inmediato para la salud, los efectos a largo plazo sí que podrían ser perjudiciales, ya que algunos herbicidas triazínicos son considerados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como posiblemente cancerígenos y algunas investigaciones así lo ponen de manifiesto [2]. Por todo ello son numerosos los esfuerzos realizados durante las últimas décadas para controlar y remediar los efectos perjudiciales sobre el entorno de los pesticidas en general [3] y de las triazinas en particular [4], empleando diversas técnicas analíticas para caracterizar sus propiedades fotoquímicas y fisicoquímicas, y los productos de su degradación en suelos y disoluciones acuosas.

Se ha comprobado que una alternativa eficiente a la degradación natural de los herbicidas triazínicos es el uso de radiación UV-visible [1,5–11], combinada en ocasiones con precursores de radicales OH [5,10,12–15], fotosensibilizadores [16–19] o fotocatalizadores [20–22]. Las técnicas que tradicionalmente se han utilizado para la detección de fotoproductos triazínicos son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida acopladas con espectrometría de masas [23–25]. No obstante, también se han empleado técnicas de desorción/ionización láser acopladas con espectrometría de masas (LDI-MS) para el análisis de herbicidas. [26–34]. Entre dichos estudios destaca el realizado por Giardini y colaboradores [26] empleando la técnica LAMMA (del inglés *laser ablation microprobe analysis*) para la caracterización de los procesos de fragmentación y agregación de clorotriazinas.

#### 3.1.1. Objetivos

En este capítulo se desarrollará una investigación sistemática de los procesos de fragmentación

y agregación supramolecular inducidos durante los experimentos de desorción/ionización láser de cuatro clorodiaminotriazinas (simazina, atrazina, terbutilazina y propazina) y dos metilmercaptotriazinas (ametrina y terbutrina).

Desde un punto de vista metodológico, el presente estudio pretende aportar a los trabajos previos el potencial de la técnica LDI para la efectiva detección de las triazinas, eliminando la necesidad de establecer combinaciones analito/matriz adecuadas para obtener resultados satisfactorios. Las triazinas serán pues desorbidas e ionizadas mediante un mecanismo de *self-matrix*, en ausencia de cromóforos que modulen su desorción e ionización. Los experimentos realizados servirán para establecer la eficiencia de dicho mecanismo y poder hacer predicciones en relación con la sensibilidad analítica de la técnica.

Por otro lado, se pretende investigar los fenómenos fotoquímicos inducidos en el proceso de desorción/ionización láser. Los procesos de fragmentación que tienen lugar en la pluma dan información sobre la estabilidad de las triazinas estudiadas frente al estrés fotolítico y térmico. Además, el estudio de los mecanismos de fotodegradación también es importante a la hora de hacer predicciones sobre el efecto que la radiación solar tiene en la degradación de estos compuestos en el medio natural, así como para la optimización de procedimientos artificiales para su degradación. En los experimentos LDI realizados se han utilizado potencias láser un orden de magnitud inferior a las utilizadas en experimentos de ablación láser LAMMA mencionados anteriormente [26]. Como verá más adelante en este capítulo, la reducción de la fluencia láser afecta a los procesos de fragmentación dominantes que sufren las triazinas.

Desde un punto de vista fundamental, los compuestos triazínicos constituyen sistemas de referencia para estudiar las interacciones intermoleculares intrínsecas en heterociclos nitrogenados [35,36]. Las triazinas constituyen un modelo rico en el que estudiar los fenómenos de agregación supramolecular de naturaleza no covalente (apilamiento) frente a la polimerización covalente, ya que incorporan en la misma molécula (1) un heterociclo aromático, (2) dos grupos amino capaces de formar puentes de hidrógeno, (3) un centro clorado electronegati-

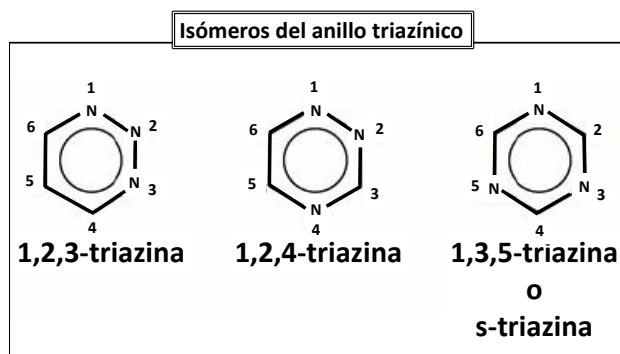


Figura 3.1: **Isómeros del anillo triazínico.** Las triazinas analizadas en este estudio son derivados de la s-triazina.

vo, en el caso de las clorotriazinas, y (4) cadenas alifáticas laterales que inducen efectos estéricos.

La mayor parte de los experimentos se han realizado en muestras preparadas con el método *solvent-free*. De este modo, nos aseguramos de que la formación de agregados pueda correlacionarse con las interacciones intermoleculares que tienen lugar en la pluma durante el proceso de desorción.

### 3.1.2. Triazinas

Químicamente son derivados de heterociclos nitrogenados. Existen tres isómeros en función de la posición que ocupen en el anillo los 3 átomos de nitrógeno, tal y como puede observarse en la figura 3.1. Los herbicidas triazínicos son derivados de la s-triazina. Existen tres clases en función del grupo funcional que ocupe la posición 2 del anillo: un átomo de cloro en las clorotriazinas, un grupo metil-tio en las metilmercaptotriazinas, y un grupo metoxi en las metoxitriazinas. Las posiciones 4 y 6 del anillo la ocupan grupos amino unidos a cadenas hidrocarbonadas con un número variable de átomos de carbono.

En la figura 3.2 se detalla la denominación, fórmula, peso molecular y estructura de las cuatro clorodiaminotriazinas y las dos metilmercaptotriazinas estudiadas. La figura 3.3 muestra sus espectros de absorción UV-Visible, medidos a partir de

disoluciones en acetonitrilo con una concentración de  $5 \text{ mgL}^{-1}$ .

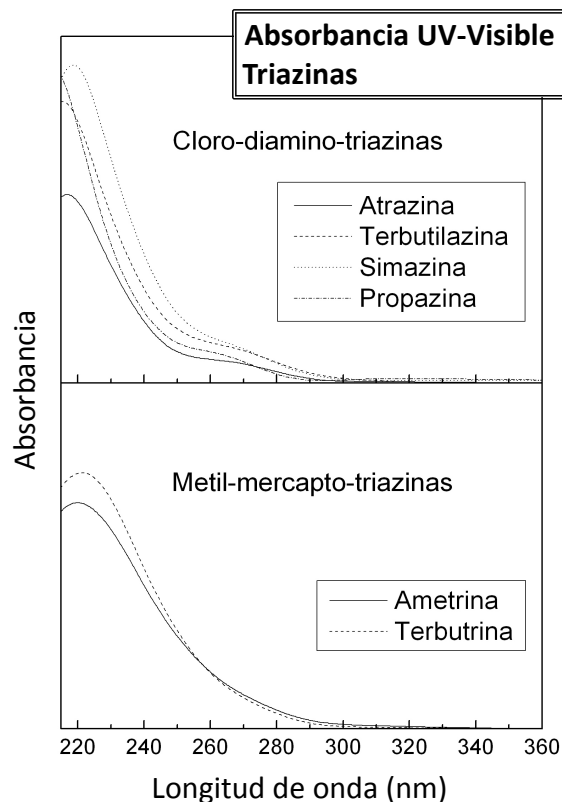


Figura 3.3: **Espectros de absorción ultravioleta-visible de las triazinas analizadas en este estudio** medidos a partir de disoluciones de las mismas en acetonitrilo (concentración:  $5 \text{ mgL}^{-1}$ ). Los espectros se han registrado con un espectrofotómetro de fibra óptica CCD (DH2000, Ocean Optics). Los experimentos LDI de este estudio se han realizado con radiación láser de 266 nm, longitud de onda a la que absorben todas las especies consideradas.

Se comprueba que todas las especies estudiadas absorben en la región UV del espectro, diferenciándose dos bandas de absorción: una intensa centrada alrededor de los 220 nm, que solapa con otra de menor intensidad centrada en torno a los 260 nm y que abarca el intervalo comprendido entre 240 y 300 nm. El solapamiento entre ambas bandas de absorción es mayor en el caso de las metilmercaptotriazinas. No se apreciaron diferencias significativas en los espectros al emplear disolventes distintos. No hemos registrado el espectro

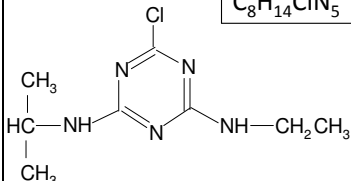
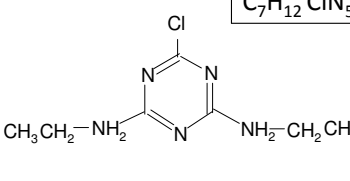
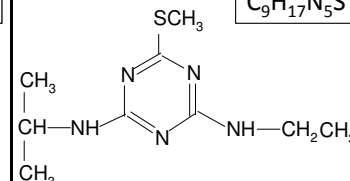
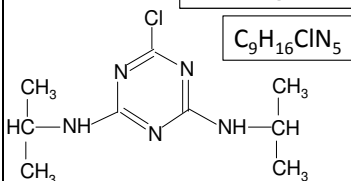
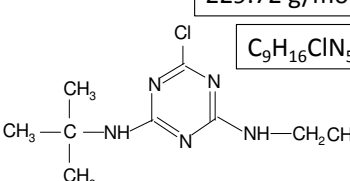
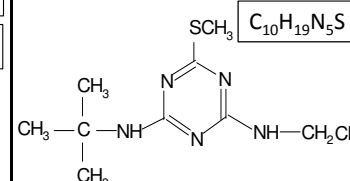
| CLORO-TRIAZINAS   |   | MERCAPTO-TRIAZINAS  |
|---|---|---|
| <b>ATRAZINA</b><br>215,69 g/mol<br>$C_8H_{14}ClN_5$<br>  | <b>SIMAZINA</b><br>201,66 g/mol<br>$C_7H_{12}ClN_5$<br>      | <b>AMETRINA</b><br>227,33 g/mol<br>$C_9H_{17}N_5S$<br>      |
| 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina   | 2-cloro-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina   | 2-metilo-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina  |
| <b>PROPAZINA</b><br>229,71 g/mol<br>$C_9H_{16}ClN_5$<br> | <b>TERBUTILAZINA</b><br>229,72 g/mol<br>$C_9H_{16}ClN_5$<br> | <b>TERBUTRINA</b><br>241,36 g/mol<br>$C_{10}H_{19}N_5S$<br> |
| 2-cloro-4,6-bis(isopropilamino)-1,3,5-triazina  | 2-cloro-4-etilamino-6-terbutilamino-1,3,5-triazina  | 2-cloro-4,6-bis(isopropilamino)-1,3,5-triazina  |

Figura 3.2: Denominación, fórmula, peso molecular y estructura de las clorotriazinas y mercaptotriazinas analizadas en este estudio.

de absorción de las triazinas en estado cristalino, pero asumimos que no presentará variaciones de relevancia en el contexto del presente estudio.

### 3.2. Discusión de resultados

Procederemos a discutir en este punto los resultados experimentales obtenidos del análisis LDI de los herbicidas triazínicos que muestra la figura 3.2, prestando especial atención a los procesos fragmentativos y de agregación supramolecular que experimentan estos compuestos.

#### 3.2.1. Aspectos técnicos y metodológicos

En la realización de los experimentos que se describen a lo largo del capítulo las muestras se han

preparado utilizando fundamentalmente el método *solvent-free*. En experimentos MALDI puntuales se utilizó también el método convencional *dried-droplet*. Para la realización de los experimentos MALDI las triazinas se mezclaron con el ácido 2,4-DHB en análisis realizados a 266 nm, o bien con el ácido  $\alpha$ -CHCA, para experimentos realizados a 355 nm. Se empleó una relación molar analito/matriz de entre 1:1000 y 1:100. Los experimentos LDI de triazinas se han realizado sintonizando el láser a 266 nm, lo que implica absorción resonante en la primera banda de absorción de los compuestos estudiados tal y como muestra la figura 3.3. Por el contrario, en el caso de los experimentos MALDI a 355 nm la absorbancia de las triazinas es prácticamente despreciable. Para caracterizar las rutas de fragmentación de las moléculas estudiadas y los procesos de agregación predominantes en cada caso se registraron espectros LDI en un intervalo de energías láser de entre 5 y 50  $\mu$ J/pulso.

Los espectros LDI a 266 nm son análogos en cada uno de los dos grupos de herbicidas triazínicos estudiados, como puede verse en la figura 3.4. En todos los casos se observan picos bien resueltos tanto para los iones padre de las triazinas estudiadas (denotados como A en los espectros) como para los fragmentos y agregados generados, observándose grupos de picos asociados a agregados de hasta 7 e incluso 8 unidades en el caso de las clorotriazinas, y de hasta 4 componentes en el caso de las mercaptotriazinas.

La estructura de los espectros es similar en muestras preparadas mediante el método *dried-droplet* (espectros no mostrados) y el *solvent-free*, si bien al emplear este último, pueden observarse agregados con un mayor número de unidades en los espectros registrados, debido principalmente a que se alcanza una mayor densidad de material en la pluma de desorción que induce procesos de agregación más eficientes.

### 3.2.2. Fragmentación en experimentos LDI de triazinas

Con el fin de analizar los procesos de fragmentación que sufren las triazinas en los experimentos realizados, la discusión se centrará en este punto en la zona de masas bajas de los espectros LDI obtenidos, en la que se encuentran los iones con una relación masa/carga inferior a la del ion padre para cada una de las especies estudiadas. Las tablas 3.1 y 3.2 muestran la relación de los principales fragmentos obtenidos en todos los casos, empleando energías láser de hasta 20  $\mu\text{J}$ /pulso.

El fragmento más intenso que se ha detectado en todos los casos, denotado como B en los espectros LDI de la figura 3.4, corresponde a la pérdida del cloro en el caso de las clorotriazinas y a la pérdida del grupo metil-tio en el caso de las metilmercaptotriazinas. De hecho, este es el único fragmento que se observa en los espectros LDI al irradiar las muestras con energías láser bajas, inferiores a 10  $\mu\text{J}$ /pulso.

A energías moderadas, de unos 20  $\mu\text{J}$ /pulso se observan los fragmentos producto de la pérdida de cadenas alifáticas laterales, denotados como C en

el caso de las clorotriazinas y E y F en el caso de las mercaptotriazinas (ver tablas 3.1 y 3.2). También se aprecian fragmentos asociados a la ruptura del anillo, denotados por la letra D en la tabla 3.1, cuya intensidad relativa es apreciable solo en el caso de las clorotriazinas y por ello no se incluye este fragmento entre los principales en el caso de las mercaptotriazinas.

Al aumentar la energía por encima de 30  $\mu\text{J}$ /pulso se observa una completa pérdida de los grupos alquilo laterales y un aumento de las señales correspondientes a iones fruto de la fragmentación del anillo.

A pesar de la gran variedad de fragmentos detectados al irradiar las muestras con pulsos láser de 50  $\mu\text{J}$ , la energía más alta que se ha utilizado, los productos B, C y D son siempre los predominantes en los espectros LDI de las clorotriazinas, y los B, E y F, en los de las mercaptotriazinas.

### Fragmentación de clorotriazinas

La similitud en los patrones de fragmentación observados en los espectros LDI de las cuatro clorotriazinas estudiadas apunta a que las cuatro moléculas experimentan una ruta de fragmentación similar durante el proceso de desorción/ionización láser. Dicha ruta supone la pérdida del átomo de cloro en primer lugar, y la subsiguiente pérdida de los grupos alquilo de las cadenas alifáticas laterales y/o la ruptura del anillo triazínico al aumentar la potencia de la radiación láser aplicada.

Si bien presentan un esquema de fragmentación común, existen diferencias relevantes entre las clorotriazinas en la secuencia de desalquilación como consecuencia del distinto tamaño de las cadenas hidrocarbonadas laterales. Las clorotriazinas que poseen cadenas de menor tamaño –simazina y atrazina– experimentan una pérdida completa de las mismas a energías láser moderadas, mientras que las que poseen cadenas laterales de mayor complejidad –terbutilazina y propazina– sufren una pérdida más progresiva de los grupos  $\text{CH}_n$ , por lo que se observa la desalquilación parcial de dichas cadenas, siendo la pérdida completa al aplicar potencias más elevadas. Estas diferencias podrían atribuirse al incremento de los grados de libertad

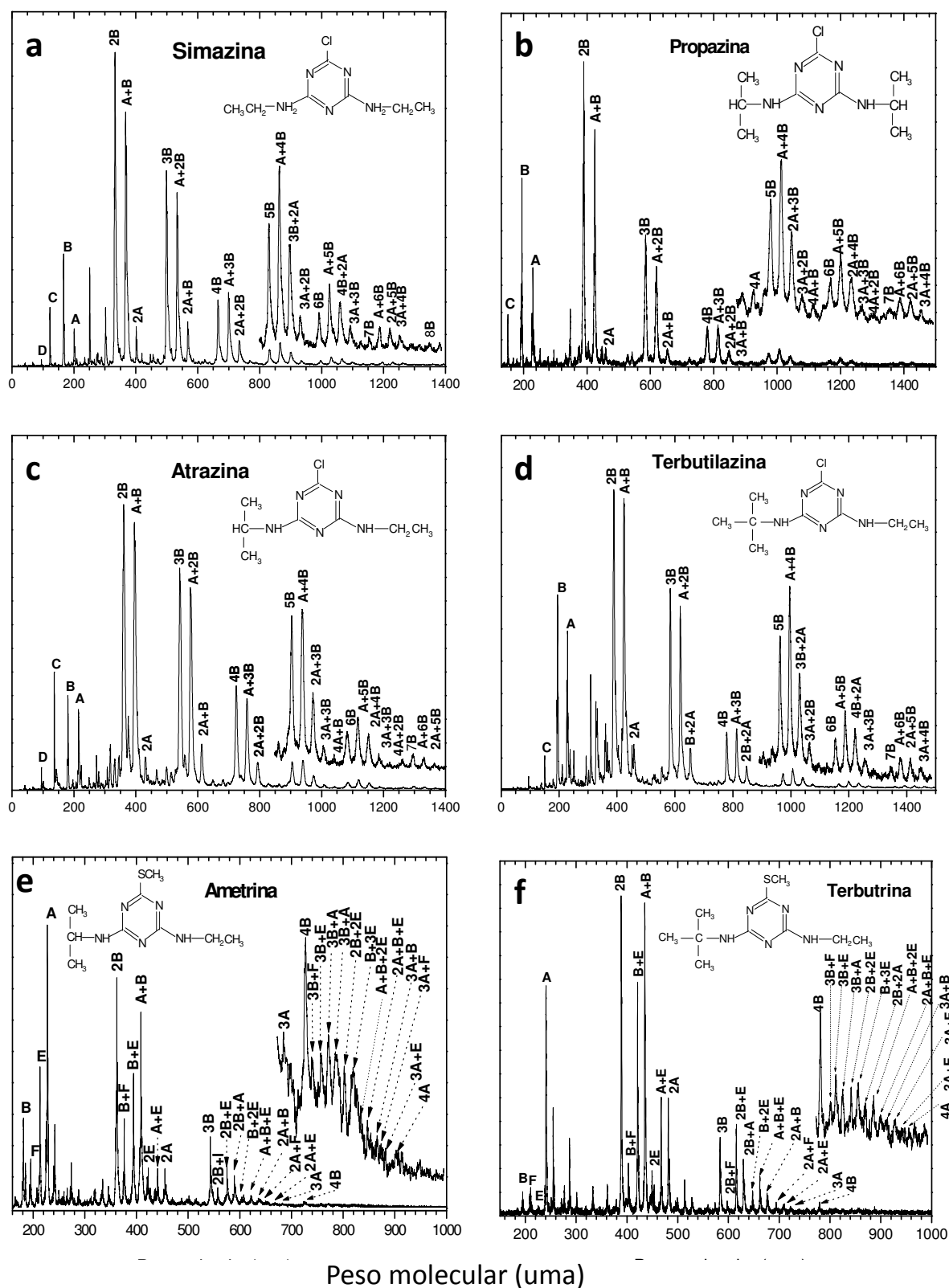
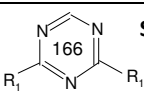
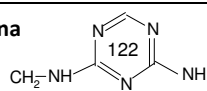

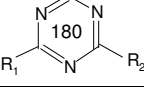
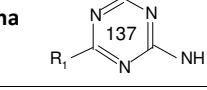

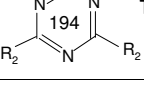
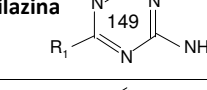

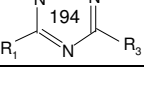
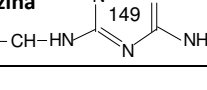



Figura 3.4: Espectros LDI de las triazinas analizadas en este estudio: simazina (A), propazina (B), atrazina (C), terbutilazina (D), ametrina (E) y terbutrina (F). Muestras preparadas mediante el método *solvent-free*. Energías aplicadas por pulso láser de 266 nm de 20  $\mu$ J.

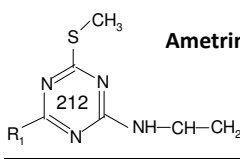
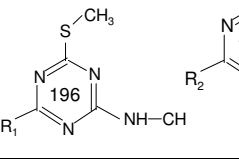
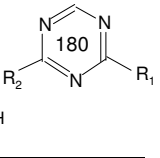
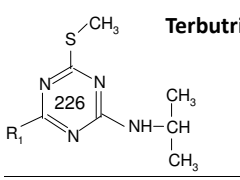
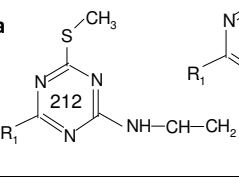
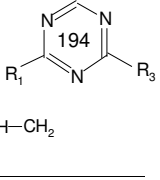
Tabla 3.1: Principales fragmentos observados en los espectros LDI de las cuatro clorotriazinas analizadas en este estudio. El peso molecular nominal en g/mol de cada uno de los fragmentos se indica en cada una de las estructuras moleculares correspondientes. Los fragmentos denotados como B, C y D se corresponden con los picos señalados con las mismas letras en los espectros LDI de las clorotriazinas que se muestran en este capítulo. Para simplificar la representación de las estructuras moleculares las cadenas alifáticas de las posiciones 4 y 6 del anillo triazínico se han designado como R1, R2 y R3, siendo su equivalencia: R1≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, R2≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CHNH y R3≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CNH. En los espectros LDI cada uno de estos fragmentos se observa como radical y/o como molécula recombinada, en sus formas protonadas y/o catiónica.

| B   | C   | D   |
|---|---|---|
|  <b>Simazina</b><br>166        |  122   |  96    |
|  <b>Atrazina</b><br>180       |  137  |  96   |
|  <b>Terbutilazina</b><br>194 |  149 |  96  |
|  <b>Propazina</b><br>194     |  149 |  110 |

interna de la molécula (capacidad calorífica) con el aumento del tamaño de las cadenas alifáticas laterales. De esta manera podría producirse una redistribución más eficiente de la energía en la molécula, de forma previa a la fragmentación de la misma, pudiéndose propiciar un enfriamiento colisional en la pluma. Es interesante señalar, que aunque en todos los casos se produzca finalmente la desalquilación completa de las moléculas al aplicar energías altas (30-50 μJ/pulso en nuestro experimento), no se observa la desaminación de los fragmentos, permaneciendo siempre los grupos NH en las posiciones 4 y 6 del anillo.

La figura 3.5 muestra de forma detallada la estructura de los picos obtenidos en el espectro de masas para los cuatro fragmentos predominantes en el proceso de desorción/ionización de la atrazina. El análisis de dicha estructura revela aspectos interesantes de los mecanismos de ionización

Tabla 3.2: Principales fragmentos observados en los espectros LDI de las dos mercaptotriazinas analizadas en este estudio. El peso molecular nominal en g/mol de cada uno de los fragmentos se indica en cada una de las estructuras moleculares correspondientes. Los fragmentos denotados como E, F y B se corresponden con los picos señalados con las mismas letras en los espectros LDI de las mercaptotriazinas que se muestran en este capítulo. Para simplificar la representación de las estructuras moleculares las cadenas alifáticas de las posiciones 4 y 6 del anillo triazínico se han designado como R1, R2 y R3, siendo su equivalencia: R1≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NH, R2≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CHNH y R3≡CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CNH.

| E  | F  | B  |
|--|--|--|
|  <b>Ametrina</b><br>212    |  196  |  180  |
|  <b>Terbutrina</b><br>226 |  212 |  194 |

y fragmentación que tienen lugar en la pluma de desorción durante el experimento.

En este punto conviene señalar que los espectros LDI de este estudio se realizaron tras llevar a cabo una cuidadosa optimización de las condiciones operativas del equipo dirigidas a maximizar la resolución en masas. Se controlaron especialmente los voltajes de extracción de los iones y el retraso entre el voltaje de extracción aplicado tras el impacto del pulso láser sobre la muestra, realizándose el oportuno calibrado de los espectros de masas con una serie de hidrocarburos poliaromáticos como patrones internos.

A la vista de tales espectros de masas puede establecerse que el ion padre de la atrazina se obtiene de forma predominante mediante la protonación de la molécula (masas 216 y 218 para los dos isótopos del cloro) en nuestras condiciones experimentales. El ion padre de la atrazina con carga positiva (masas 215 y 217) se observa con una intensidad 0.2 veces menor que el pico protonado.



En el caso del fragmento clorado B las formas protonada e ionizada presentan una intensidad similar (masas 180 y 181, respectivamente). Sin embargo, el pico más intenso corresponde a la especie BH (en su forma protonada,  $(BH)H^+$  m/z 182), formada mediante la recombinación del radical B con un hidrógeno que ocupa la posición del átomo de cloro.

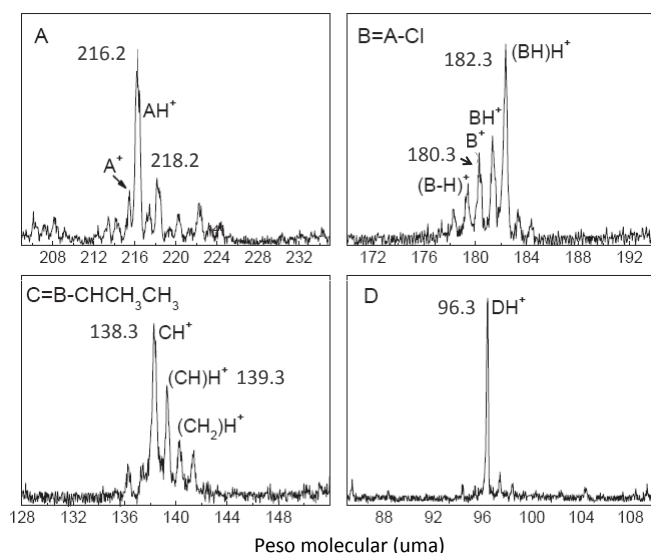


Figura 3.5: Estructura detallada de los picos del espectro LDI de la atrazina correspondientes al ion padre (A), y los principales fragmentos obtenidos en nuestras condiciones experimentales (B, C y D).  $A^+$  y  $B^+$  son iones positivos del ion padre y el fragmento clorado, respectivamente.  $AH^+$ ,  $BH^+$ ,  $CH^+$  y  $DH^+$  son las moléculas recombinadas de los radicales B y C con hidrógeno, que ocupa la posición del cloro. B-H se forma a partir de la pérdida de H de una de las cadenas laterales.

Curiosamente, también se observa un pico de intensidad considerable correspondiente al birradical B-H, formado a partir de la deshidrogenación de una de las cadenas laterales del fragmento B. Más adelante se mostrará que los radicales B y B-H juegan un papel importante en las reacciones de asociación que ocurren en la pluma.

El fragmento C es también un birradical, en este caso formado por la pérdida del átomo de cloro y de una de las cadenas laterales de la triazina. La figura 3.5 muestra que a partir de la estructura del fragmento C, este puede asignarse a la forma

$CH_n^+$ , que se relaciona con los diferentes grados de protonación y consiguiente incorporación de átomos de hidrógeno. En el caso del fragmento D, tan sólo se observa la forma  $DH^+$ .

### Fragmentación de mercaptotriazinas

Los patrones de fragmentación observados en el caso de las metilmercaptotriazinas difieren en algunos aspectos notables de los descritos previamente para las clorotriazinas. La principal diferencia radica en la mayor estabilidad que posee el grupo  $SCH_3$  frente al cloro, lo cual favorece la formación de fragmentos en los que se mantiene el grupo metil-tio en la molécula.

La figura 3.2 muestra los principales fragmentos observados en los espectros LDI obtenidos. En este caso, el fragmento predominante procedente de la ametrina —E— y la terbutrina —F— se ha asignado a la misma estructura, generada por la pérdida de grupos metilo de las cadenas hidrocarbonadas laterales manteniendo el grupo  $SCH_3$  en la posición 2 del anillo. La intensidad relativa del resto de iones generados no alcanza el 40 %, si bien entre estos picos de menor intensidad destaca el fragmento B, procedente de la pérdida del grupo  $SCH_3$  de la molécula original.

Aunque en la tabla 3.2 se ha optado por representar los fragmentos E y F con el grupo metil-tio intacto, la pérdida del metilo de dicho grupo en lugar del metilo de una cadena lateral también es posible. La resolución en masas obtenida al realizar los experimentos con este tipo de triazinas hace imposible discernir de dónde procede el grupo metilo que se pierde. La asignación realizada en la tabla 3.2 se apoya en el hecho de que para cada uno de los fragmentos que conserva el grupo metil-tio intacto, existe otro igual salvo por la pérdida del grupo  $SCH_3$ .

En cuanto al ritmo de desalquilación observado en este caso, el comportamiento que experimentan las metilmercaptotriazinas es análogo al de las clorotriazinas que tienen cadenas laterales más complejas —terbutilazina y propazina—, de manera que a energías moderadas ( $20 \mu J/pulso$  en nuestro experimento) se observan fragmentos que han perdido diferente número de grupos  $CH_n$ , no lle-

gándose a producir la desalquilación completa en todos los casos a las energías más altas empleadas en el presente estudio (50  $\mu\text{J}/\text{pulso}$ ).

Del comportamiento descrito para los dos grupos de triazinas se deduce que tanto la complejidad de las cadenas alifáticas laterales como el grupo que ocupa la posición 2 del anillo son factores determinantes en los procesos de fragmentación que afectan a las triazinas estudiadas.

### 3.2.3. Agregación supramolecular en experimentos LDI de triazinas

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las condiciones que rigen los procesos de desorción/ionización láser inducen tanto la ionización y fragmentación de las especies desorbidas en la pluma como la posible agregación de las mismas en función de las interacciones intermoleculares existentes. En la figura 3.4, que muestra los espectros LDI de las triazinas estudiadas, puede observarse la relación de iones de  $m/z$  superior al ion padre (A) y que son producto de la agregación del mismo y/o de los principales fragmentos generados en el proceso de desorción. De forma general, los fragmentos que contribuyen de forma notable en el proceso de formación de agregados son, además del A, el fragmento B —que pierde el grupo que sustituye la posición 2 en el anillo triazínico—, el C —fragmento B que pierde tres grupos metilo—, y los fragmentos E y F —pérdida de uno o dos grupos metilo respectivamente conservando el grupo metil-tio en la posición 2 del anillo—.

### Agregación de clorotriazinas

Discutiremos en este punto el proceso de agregación supramolecular que experimentan las clorodiaminotriazinas estudiadas en el proceso de desorción/ionización láser. Experimentalmente se observa que la señal correspondiente a los agregados domina los espectros LDI registrados, observándose en los espectros de masas agregados de hasta 7 e incluso 8 unidades, formando grupos de entre tres y cinco picos, tal y como ilustran los paneles a, b, c y d de la figura 3.4. La diferencia de masa entre estos grupos de picos correlaciona con el peso mo-

lecular del fragmento declorado (B). De hecho, las bandas de mayor intensidad en cada grupo, son las que se asignan a agregados que contienen diferentes combinaciones del ion padre (A) y su fragmento declorado (B):  $A_mB_{n-m}$ . En las figuras también se muestra la asignación de cada uno de los picos de los espectros de masas.

Los *clusters* que producen señales más intensas en el espectro se corresponden con complejos de  $n$  unidades con estequiometrías  $m=0$  (correspondiente a agregados del tipo  $B_n$ ) o  $m=1$  (correspondiente a agregados del tipo  $AB_{n-1}$ ). La intensidad relativa de los agregados con  $m \geq 1$ , que son aquellos que contienen una o más unidades del ion padre, aumenta al incrementarse el número de unidades del complejo. Mientras que para los agregados más ligeros, el pico  $B_n$  es dominante, para los más pesados son los agregados del tipo  $AB_{n-1}$  y  $A_2B_{n-2}$  los que ganan intensidad con respecto a los  $B_n$ .

Puesto que el componente principal de los agregados es el fragmento B, que se genera por la pérdida del átomo de cloro en el proceso de desorción/ionización láser de las clorotriazinas, parece natural asumir que las reacciones de asociación y agregación tienen lugar de forma predominante en fase gaseosa entre las triazinas que se desorben y los fragmentos que se generan en estadios tempranos en el proceso.

La figura 3.6 muestra en detalle la estructura de los principales dímeros (BB, AB) y trímeros (BBB y ABB) observados en el espectro de masas de la atrazina, en un intento de analizar el papel de la asociación covalente frente a la agregación no covalente en la formación de agregados en el caso que nos ocupa. En el dímero BB el pico más intenso puede asignarse a la asociación covalente de dos radicales de tipo B protonados ( $m/z$  361). Un segundo complejo, de dos unidades menos de masa ( $m/z$  359) se forma a partir de la asociación de dos fragmentos B-H ( $m/z$  360), lo cual tendrá lugar probablemente mediante enlace covalente entre los radicales hidrocarbonados laterales. Por otro lado, el pico de masa 362 puede asociarse con la agregación no covalente de radicales tipo B y/o BH. Por el contrario, en la formación del dímero AB domina la agregación no covalente ( $m/z$  395 y 397). En este caso también se observa un pico de menor

tamaño, de nuevo a dos unidades de masa del anterior ( $m/z$  393) que podría atribuirse a la unión covalente de las cadenas laterales tras la pérdida de un átomo de hidrógeno de cada una de ellas.

Para los complejos de tipo BBB y ABB se aprecia la existencia de enlaces cruzados similares, asignados a trímeros de naturaleza covalente (masas 538 para BBB y 572 para ABB), aunque los picos más prominentes se relacionan con trímeros de tipo no covalente. Los picos más complejos y de menor resolución en masas observados en el caso de los tetrámeros y agregados más pesados, son consistentes con la formación combinada de *clusters* de tipo covalente y no covalente, aunque la resolución en masas del equipo no nos permite analizar en detalle la estructura de dichos picos en esta zona del espectro de masas.

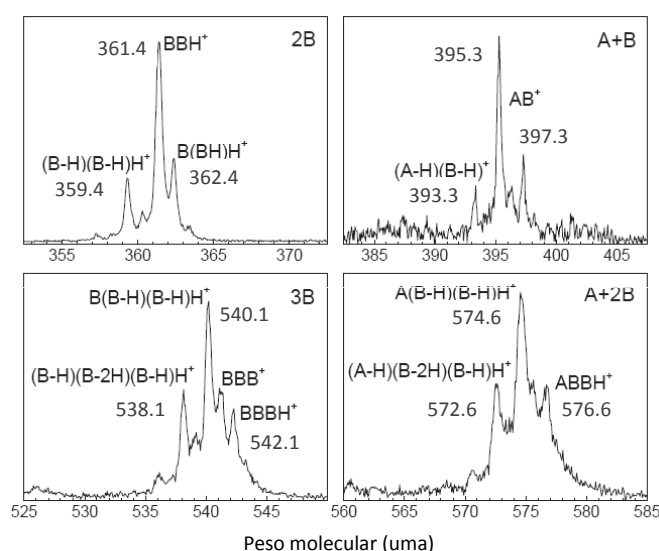


Figura 3.6: Estructura detallada de los picos del espectro LDI de la atrazina correspondientes a los dímeros BB y AB y a los trímeros BBB y ABB, siendo A el ion padre y B su fragmento de clorado. Los radicales deshidrogenados A-H, B-H y B-2H pueden combinarse de dos formas, mediante enlaces covalentes cruzados de las cadenas alifáticas laterales con ellos mismos y/o, mediante interacciones de tipo no covalente con A y B. Estos últimos, A y B, también agregan de forma no covalente para formar el dímero.

Llegados a este punto resulta interesante comparar los resultados obtenidos en nuestro experi-

mento con el estudio pionero realizado por Giardini y colaboradores de la simazina, la atrazina y la propazina [26] utilizando la técnica LAMMA. La potencia láser utilizada en dicho estudio es un orden de magnitud superior a la empleada en nuestros experimentos LDI. Como consecuencia, se observa una mayor fragmentación de las especies estudiadas. Los picos más intensos en los espectros LAMMA corresponden a los fragmentos más ligeros, con un peso molecular inferior a las 100 uma. Las rutas de fragmentación propuestas son pues diferentes a las planteadas en nuestro caso. En particular, la apertura del anillo triazínico es dominante frente a la fragmentación de las cadenas hidrocarbonadas laterales e incluso frente a la de cloración de las moléculas de partida. De hecho, se observan diferentes fragmentos que contienen el átomo de cloro, incluido fragmentos procedentes de la ruptura directa del anillo triazínico en la molécula original.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestras condiciones experimentales, que propician la de cloración del ion padre y la posterior fragmentación de dicho fragmento de clorado. En los experimentos LAMMA también se detecta un número más limitado de agregados (hasta trímeros para la simazina y la propazina y tetrámeros para la atrazina), no conteniendo ninguno de ellos más de una unidad del ion padre.

### Agregación de mercaptotriazinas

Los procesos de agregación predominantes en el caso de las metilmercaptotriazinas difieren de los descritos para las clorotriazinas. Este hecho se debe principalmente a que la generación del fragmento B en el caso de las mercaptotriazinas es un proceso poco eficiente. Por otra parte, la formación de fragmentos por desmetilación del ion padre, permaneciendo intacto el grupo metil-tio (fragmentos E y F) sí que resulta ser un proceso eficiente en este caso.

Al existir una densidad importante de iones E y F en la pluma, podemos observar tanto agregados formados por varias unidades del fragmento B, como la interacción de estas con una o varias unidades del ion padre, y/o los fragmentos E y F. Lógicamente, también se producen interacciones entre una o varias unidades del ion padre y los

fragmentos E y F.

### 3.2.4. Experimentos MALDI de triazinas

La figura 3.7 muestra dos espectros MALDI típicos de la atrazina empleando como matrices el 2,4 DHB (panel B, radiación láser de 266 nm) y el  $\alpha$ -CHCA (panel C, radiación láser de 355 nm). En ambos casos se ha utilizado el método de preparación de muestras libre de disolvente *solvent free*, por lo que las muestras analizadas consisten en una mezcla de atrazina y la matriz correspondiente en polvo en una proporción molar 1:1000.

Experimentos MALDI realizados utilizando el método convencional de preparación de muestras *dried-droplet* con metanol como disolvente proporcionan espectros de masas cualitativamente similares.

En las medidas realizadas a 266 nm tanto la matriz como la atrazina absorben la radiación láser. La mayoría de los picos observados en este espectro se asocian a la matriz y sus fragmentos. Los únicos dos picos asociados con el pesticida son el ion padre (A) y el fragmento declorado (B), ambos en su forma protonada. Además de no observarse otros fragmentos, la señal procedente de los agregados es insignificante, incluso para los dímeros BB y AB, que constituyen las bandas de intensidad relativa mayor en los espectros LDI.

En el espectro MALDI realizado a 355 nm (panel C, figura 3.7), fuera de la banda de absorción UV de la atrazina, la fragmentación de la molécula original es menor incluso que en el caso anterior y también se suprime la agregación de forma eficiente. La señal procedente de la matriz es menor en este caso.

El menor grado de fragmentación que se observa en condiciones MALDI, incluso a 266 nm, comparado con los experimentos LDI de triazinas en estado puro, se relaciona con la disipación eficiente de energía inducida por las moléculas de matriz. El resultado es una desorción más suave de las triazinas estudiadas. La supresión de los procesos de agregación supramolecular se relaciona con la dilución del analito en las moléculas de matriz en la pluma de desorción. La agregación por tanto se

vuelve insignificante como consecuencia del reducido número de colisiones que se producen entre los compuestos triazínicos en estado gaseoso.

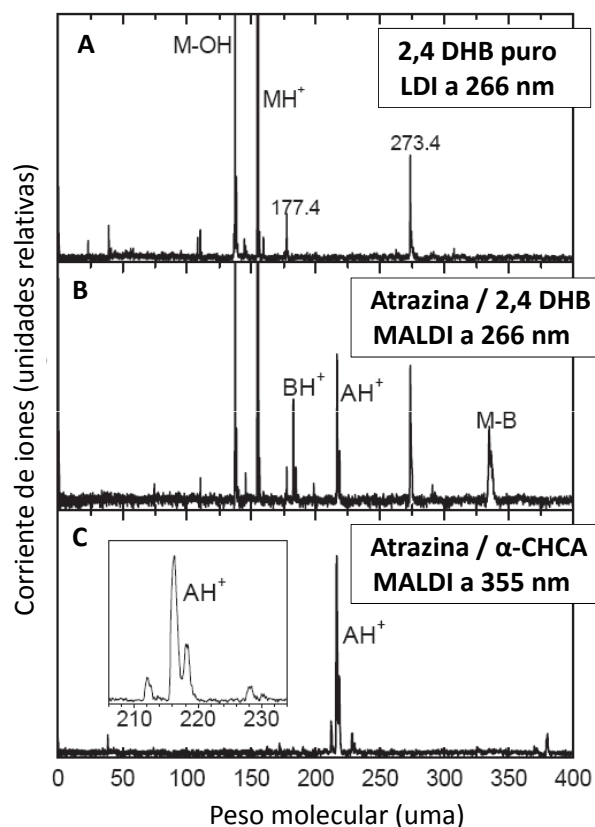


Figura 3.7: Espectros MALDI de la atrazina empleando 2,4-DHB y  $\alpha$ -CHCA como matrices. A) Espectro LDI del 2,4-DHB puro medido a 266 nm. B) Espectro MALDI de la atrazina empleando 2,4-DHB como matriz medido a 266 nm. C) Espectro MALDI de la atrazina empleando  $\alpha$ -CHCA como matriz medido a 355 nm. La proporción molar analito/matriz es de 1:1000. Todas las medidas están realizadas sobre muestras preparadas con el método *solvent-free*. Se ha empleado una energía láser de 10  $\mu$ J/pulso. En el panel C) aparece ampliada la banda correspondiente a la atrazina protonada. La estructura muestra un doble pico debido a la presencia de ambos isótopos del cloro ( $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ ).

Los espectros presentados en la figura 3.7 confirman el buen rendimiento de la técnica MALDI para la detección de derivados triazínicos y apoya la fiabilidad del método de preparación de mues-

tras libre de disolvente para el análisis de estos compuestos, algo que, para nuestro conocimiento, no se había estudiado con anterioridad.

### 3.3. Conclusiones

El proceso de desorción/ionización inducido por el láser de clorodiaminotriazinas y metilmercaptotriazinas produce (1) la fragmentación de las moléculas de partida de forma eficiente y (2) la formación de numerosos agregados supramoleculares covalentes y no covalentes. A lo largo de este capítulo se han discutido los resultados experimentales obtenidos en el análisis de ambos procesos.

A la vista de tales resultados se puede concluir que el grupo que ocupa la posición 2 del anillo (átomo de cloro y grupo metil-tio en los dos grupos de s-triazinas estudiados) influye de forma clara en la estabilidad de la molécula, siendo más estables aquellas que poseen como sustituyente el azufre frente al cloro. Este hecho afecta tanto a la fragmentación de la molécula como a las interacciones supramoleculares que se producen entre la misma y los fragmentos que se forman en el proceso de desorción/ionización láser.

Bajo nuestras condiciones experimentales la principal ruta de fragmentación de las cuatro clorodiaminotriazinas estudiadas supone en primer lugar la pérdida del átomo de cloro, seguida de la desalquilación parcial o total de las cadenas laterales y de la ruptura del anillo triazínico. Por el contrario, no se han observado evidencias de la pérdida de los grupos amino que ocupan las posiciones 4 y 6. Los fragmentos predominantes son radicales y/o moléculas que han recombinado con átomos de hidrógeno en la pluma de desorción.

En cuanto a los mecanismos de ionización de las clorotriazinas se puede concluir que la ionización de las moléculas de partida se produce preferentemente mediante protonación, mientras que el fragmento declorado B se observa en los espectros de masas tanto en su forma protonada como ionizada (por pérdida de un electrón). Tanto el ion padre A como el fragmento declorado B son especies que juegan un papel importante en las reacciones de asociación que tienen lugar en la pluma. En el

caso de las metilmercaptotriazinas, y debido a la mayor estabilidad que aporta a la molécula el grupo metil-tio, la (foto)fragmentación se asocia con la desalquilación parcial, previa a la pérdida del grupo metil-tio.

En el caso de las clorotriazinas la formación de complejos pesados en la pluma de desorción es muy efectiva. De hecho, la señal procedente de estos compuestos es la que domina los espectros de masas para las especies estudiadas, detectándose agregados de naturaleza covalente y no covalente de hasta siete unidades. Dichos complejos están formados principalmente por iones declorados y por el ion padre, siendo predominante la presencia de los primeros en los agregados más ligeros y de los últimos en los más pesados. En el caso de los tetrámeros y agregados de mayor tamaño, la población de complejos con uno o dos iones padre domina la distribución de masas, a pesar de que los picos que muestran mayor intensidad relativa siguen siendo los asignados complejos que contienen el fragmento declorado en mayor proporción.

No encontramos una razón clara que explique el hecho de que la incorporación de un mayor número de iones padre en los complejos gane relevancia con el aumento del tamaño de los mismos. Posibles causas pudieran ser que por un lado fuese más eficiente la ionización de heteroagregados que contengan la molécula original, o bien, que la disposición de las unidades en los agregados favorezca interacciones atractivas con la nube electrónica del átomo de cloro. La presencia del átomo de cloro en el ion padre parece perturbar las interacciones reduciendo la estabilidad de los agregados más ligeros. Esto puede atribuirse a los efectos estéricos inducidos por el átomo de cloro y también por la reducción de la densidad electrónica de tipo  $\pi$  en el anillo triazínico favorecida por la electronegatividad del cloro.

Los complejos covalentes surgen de la asociación de radicales producidos en estadios tempranos del proceso de desorción/ionización láser. En este caso, la polimerización a través de enlaces cruzados de las cadenas laterales parece ser el mecanismo principal de formación de agregados. Por otro lado, los agregados de naturaleza no covalente pueden relacionarse con configuraciones en columna estabilizadas por interacciones intermoleculares.

res del tipo puentes de hidrógeno entre los grupos amino laterales, asistidas por interacciones electrónicas de tipo  $\pi$  entre los anillos triazínicos.

En el caso de las metilmercaptotriazinas, al generarse de forma eficiente múltiples fragmentos que contienen el átomo de azufre, y al no producirse un dominio claro de unos frente a otros, se forman múltiples complejos de igual número de unidades constituidos por una mayor variedad de fragmentos con una contribución similar.

En el contexto del presente estudio se han realizado de forma paralela experimentos MALDI en muestras de atrazina con 2,4-DHB y  $\alpha$ -CHCA. Los resultados muestran que el uso de la técnica MALDI para el análisis de triazinas empleando muestras preparadas con el método *solvent-free*, es apropiado

para el estudio analítico de dichos compuestos. Tanto con la técnica LDI como con la técnica MALDI, el ion padre de la atrazina se detecta en su forma protonada. Sin embargo, el análisis MALDI de las triazinas reduce de forma considerable la fragmentación de las mismas debido a la acción de la matriz, que favorece la desorción suave del analito de interés. En estas condiciones también se suprime la formación de complejos en la pluma como consecuencia de la dilución de los compuestos triazínicos en la matriz de forma eficiente, y la consiguiente reducción en el número de colisiones de asociación que tienen lugar en la fase gaseosa. Al emplear equipos MALDI comerciales que cuentan con láseres de nitrógeno que emiten radiación a 337 nm, se espera un comportamiento similar al descrito en este capítulo bajo nuestras condiciones experimentales.

---

## Bibliografía

---

- [1] S. Navarro, N. Vela, M.J. Jiménez, G. Navarro. *Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory conditions*. Science of Total Environment 329 (1): 87-97 (2004)
- [2] J.A. Mcelroy, R.E. Gangnon, P.A. Newcomb, M.S. Kanarek, H.A. Anderson, J.V. Brook, A. Trentham-Dietz, P.L. Remington. *Risk of breast cancer for women living in rural areas from adult exposure to atrazine from well water in Wisconsin*. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology 17 (2): 207-214 (2007)
- [3] H.D. Borrows et al. *Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 67 (2):71-108 (2002).
- [4] L.M. Canle, M.I. Fernández, J.A. Santaballa. *Developments in the mechanism of photodegradation of triazine-based pesticides*. Journal of Physical Organic Chemistry 18 (2):148-155 (2005)
- [5] E. Evgenidou, K. Fytianos. *Photodegradation of Triazine Herbicides in Aqueous Solutions and Natural Waters*. Journal of Agricultural Food and Chemistry 50 (22): 6423-6427 (2002)
- [6] Y. Sanlaville, P. Schmitt, M. Mansour, P. Meallier. *Direct Photodegradation of terbutylazine in aqueous phase*. Fresenius Environmental Bulletin 6: 418-424 (1997)
- [7] B.E. Pape, J. Zabik. *Photochemistry of bioactive compounds. Solution-phase photochemistry of symmetrical triazines*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 20 (2): 316-320 (1972)
- [8] O.L. Brun, N. Merlet, J.P. Croue, M. Doré. *Phototransformations de composés phytosanitaires en milieu aqueux*. Sciences et Technologies de L'Eau. 26 (2): 97-101 (1993)
- [9] F.P. Bournige, J.I. Chapman, H. Kerai, J.L. Duval, J.G. Green, D. Hamilton. *The degradation of atrazine and other pesticides by photolysis*. Journal of Chartered Institution Water Environmental Management 9 (3): 417-423 (1995)
- [10] F.J. Bentrán, M. González, F.J. Rivas, P. Alvarez. *Aqueous UV irradiation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation of atrazine first degradation products: deethylatrazine and deisopropylatrazine*. Environmental Toxicology and Chemistry 15 (6): 868-872 (1996)
- [11] K. Lányi, Z. Dinya. *Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea-, and thilcarbate- type herbicides*. Microchemical Journal 80 (2): 79-87 (2005)
- [12] M. Azenha, H.D. Burrows, M. Canle L., R. Coimbra, M.I. Fernández, M.V. García, M.A. Peiteado, J.A. Santaballa. *Kinetic and mechanistic aspects of the direct photodegradation of atrazine, atraton, ametryn and 2-hydroxyatrazine by 254 nm light in aqueous solution*. Journal of Physics and Organic Chemistry 16 (8): 498-503 (2003)

- [13] O. Cernák, M. Cernádová. *Treatment of atrazine and other pesticides. Laboratory studies.* Water Supply 10: 171-176 (1992)
- [14] J.K. Laat, M. Dore, H. Suty. *Oxidation de s-triazines par les precedes d'oxydatyon radicalaire. Sous-produits de reaction et constantes cinétiques de réaction.* Revue des Sciences de L'Eaux 8 (1): 23-42 (1995)
- [15] J.L. Acero, K. Stemmler, U. Von Gunten. *Degradation kinetics of atrazine and its degradation products with ozone and OH radicals: a predictive tool for driving water treatment.* Environmental Science and Technology 34 (4): 591-597 (2000)
- [16] N. Burkhard, J.A. Guth. *Photodegradation of atrazine, atraton and ametryne in aqueous solution with acetone as photosensitiser.* Pesticide Science 7: 65-71 (1976)
- [17] M. Rejto, S. Saltzman, A.J. Acher, L. Muszkat. *Identification of sensitized photooxidation products of s-triazine herbicides in water.* Journal of Agricultural Food and Chemistry 31 (1): 138-142 (1983)
- [18] G. Durand, D. Barceló, J. Albaigés, M. Mansour. *Utilisation of liquid chromatography in aquatic photodegradation studies of pesticides: A comparison between distilled water and seawater.* Chromatographia 29: 120-124 (1990)
- [19] J. Obedand, E. Bellmann, J. Bendig. *Sensitized photocatalytic oxidation of herbicides using natural sunlight.* Journal of Photochemistry and Photobiology A 108 (1): 89-93 (1997)
- [20] S. Parra, S.E. Stanca, I. Guasaquillo, K. R. Thampi. *Photocatalytic degradation of atrazine using suspended and supported TiO<sub>2</sub>.* Applied Catalysis B: Environmental 51 (2): 107-116 (2004)
- [21] V. Héquet, P.L. Cloirec, C. González, B. Meunier. *Photocatalytic degradation of atrazine by porphyrin and phthalocyanine complexes.* Chemosphere 41 (3): 379-386 (2000)
- [22] E. Pelizzetti, V. Maurino, C. Minero, V. Carlin, E. Pramauro, O. Zerbinat, M.L. Tosato. *Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides.* Environmental Science and Technology 24 (10): 1559-1565 (1990)
- [23] A. Kiss, S. Rapi. Cs. Csutorás. *GC/MS studies on revealing products and reaction mechanism of photodegradation of pesticides.* Microchemical Journal 85 (1): 13-20 (2007)
- [24] S. Chiron, D. Barceló. *Determination of pesticides in drinking water by on-line solid-phase disk extraction followed by various liquid chromatographic systems.* Chromatography 25: 167-173 (1993)
- [25] D. Barceló, G. Durand, N. Bertrand, J. Albaigés. *Determination of aquatic Photodegradation products of selected pesticides by GC-MS and LC-MS.* The Science of Total Environment 132 (2-3): 283-296 (1993)
- [26] A. Giardini-Guidoni, A. Mele, G. Pizzella, R. Teghil. *Laser Photolysis of chlorodiaminotriazines and detection of their fragmentation and clusterization products.* Organic Mass Spectrometry 26: 779-785 (1991)
- [27] K. Drozdowska, A. Ksiazczak, H. Boniuk. *Thermal degradation of triazine herbicides substituted by Cl. Identification of triazine degradation products.* Termochimica Acta 424 (1-2): 123-129 (2004)
- [28] D. Braun, R. Ghahary, H. Pasch. *Triazine-based polymers:4. MALDI-MS of triazine-based polyamines.* Polymer 37 (5): 777-783 (1996)
- [29] S.A. Bufo, M. D'auria, L. Scrano, R. Teghil. *Determination of herbicide residues by laser microprobe mass analysis (lamma).* Int. J. Environ. Anal.Chem. 84: 39 (2004)



- 
- [30] G. Krier, C. Masselon, J.F. Muller, S. Nelieu, J. Einhorn. *Laser-desorption fourier-transform mass-spectrometry of triazines adsorbed on solid-phase extraction membranes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 8 (1): 22 (1994)
- [31] J. Horak, W. Werther, E.R. Schmid. *Optimisation of the quantitative determination of chlormequat by matrix- assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 15 (4): 241-248 (2001)
- [32] Y. Cheng, D.M. Hercules. *Studies of pesticides by collision-induced dissociation, postsource-decay, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry 12 (5): 590-598 (2001)
- [33] Y. Cheng, D.M. Hercules. *Quantitative estimation of geometric isomers by post-source decay MALDI MS*. Microchemical Journal 72 (3): 255-259 (2002)
- [34] J.R. Whiteaker, K.A. Prather. *Detection of pesticide residues on individual particles*. Analytical Chemistry 75 (1): 49-56 (2003)
- [35] V.E. Borisenko, E.E. Kolmakov, A. Koll, A.G. Rjasnyi. *Heterocyclic aromatic amines in H-bonded complexes (1:1 and 1:2 composition) in solutions with various proton acceptors*. Journal of Molecular Structure 828 (1-3): 116-129 (2007)
- [36] T.J. Mooibroek, P. Gamez. *The s-triazine ring, a remarkable unit to generate supramolecular interactions*. Inorganica Chimica Acta 360 (1): 381-404 (2007)



## CAPÍTULO 4

---

### Procesos de agregación supramolecular en experimentos LDI/MALDI-TOF de PAHs y asfaltenos

---

En este capítulo se estudian los procesos de agregación supramolecular que tienen lugar durante el proceso de desorción/ionización láser (LDI) de una serie de hidrocarburos aromáticos policíclicos modelo (PAHs, del inglés *polycyclic aromatic hydrocarbons*) y de asfaltenos procedentes del petróleo y del carbón, con el objetivo de caracterizar sus distribuciones de masas. En el caso de los asfaltenos la tarea es especialmente compleja debido a su polidispersidad, complejidad estructural y fuerte tendencia a formar agregados. Para la realización de los experimentos se han utilizado diferentes métodos de preparación de muestras con el fin de discutir su fiabilidad y proponer estrategias útiles que permitan aprovechar el potencial de la técnica para la caracterización de compuestos de naturaleza covalente y no covalente en sistemas complejos constituidos por especies derivadas del carbono. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos estudiados agregan fácilmente en la pluma de desorción, favoreciéndose dicho efecto al emplear muestras densas, radiación láser de alta potencia y condiciones de extracción continua de iones.

De la caracterización de PAHs y sus agregados se puede concluir que la tendencia a formar agregados en ausencia de grupos polares correlaciona con el tamaño del sistema policondensado y con su grado de pericondensación. Para los asfaltenos extraídos del petróleo se obtienen distribuciones centradas en masas inferiores a 500 uma, pero con colas que se extienden hacia masas más altas ( $\approx 3000$  uma), resultando un peso molecular promedio de  $\approx 900$  uma. Los asfaltenos procedentes del carbón muestran distribuciones más estrechas (anchura a media altura de  $\approx 150$  uma) con un peso molecular promedio de  $\approx 340$  uma. Los espectros LDI obtenidos en ambos casos evidencian la formación de agregados de naturaleza no covalente durante el proceso de desorción, siendo este fenómeno más relevante en el caso de los asfaltenos del petróleo. Esta fuerte tendencia a formar agregados parece ser la responsable de la disparidad de resultados obtenidos por grupos de investigación independientes al analizar pesos moleculares de asfaltenos mediante LDI-MS. Desde un punto de vista estructural, a partir de los estudios realizados puede inferirse que los asfaltenos están constituidos por un único sistema de anillos poliaromáticos fusionados.



## 4.1. Introducción

La caracterización química a nivel molecular de compuestos derivados del carbono es un campo de investigación tremendamente dinámico al que han contribuido numerosos grupos de investigación durante años [1–5]. Existe una gran variedad de compuestos derivados del carbono de interés fundamental, técnico, medioambiental e incluso astroquímico [4], y son muchos los estudios realizados sobre los mismos empleando un amplio abanico de técnicas experimentales [6–16].

La descripción microscópica de estas sustancias tiene una gran relevancia para entender sus propiedades fisicoquímicas. La mejora que han experimentado las técnicas de espectrometría de masas con el paso del tiempo ha supuesto un impulso considerable a la investigación en el campo, dando como resultado la proliferación de análisis precisos enfocados hacia la determinación de la composición, estructura y distribución de pesos moleculares de hidrocarburos poliaromáticos y especies derivadas del carbono de diverso tamaño y grado de complejidad [17–32].

En el caso concreto de los asfaltenos, y debido a su relevancia desde un punto de vista tecnológico [1, 33], se han publicado numerosos estudios entre los que destacan los realizados mediante espectroscopia de ionización ciclotrónica resonante de alta resolución (FT-ICR), que ha identificado la estequiometría de miles de compuestos de naturaleza polar generados mediante diferentes técnicas de vaporización e ionización [21, 34–44], estudios sistemáticos de espectrometría de masas basados en la ionización a presión atmosférica [45–47], la desorción por campo [32, 45, 48] y la desorción/ionización láser (LDI) [20, 45, 47, 49–56]. El considerable avance de este tipo de estudios ha llevado a acuñar el término “petroleómica” para definir el campo [21, 36, 37].

En nuestro caso explotaremos el potencial que presentan las técnicas láser acopladas con espectrometría de masas para el estudio de los asfaltenos: se simplifica enormemente el tratamiento de la muestra, ya que no se requiere la adición de sustancias que actúen como matriz o agentes catiónizantes, además de tener un gran rendimiento y

sensibilidad en un amplio intervalo dinámico capaz de detectar familias de compuestos de abundancia diversa.

### 4.1.1. Objetivos

El objetivo global de este capítulo y de los sucesivos relacionados con el estudio LDI/MALDI-TOF de hidrocarburos poliaromáticos y asfaltenos (cap. 5 y 6) es proporcionar una perspectiva general de los intentos desarrollados por nuestro grupo para caracterizar estos compuestos y dilucidar los procesos de agregación relevantes que experimentan durante el proceso de desorción/ionización láser y que afectan a los espectros de masas obtenidos.

A partir de los resultados del análisis de los PAHs modelo y los experimentos realizados sobre muestras de asfalto extraídas del petróleo y del carbón, se determinará la distribución de masas del monómero de asfalto en cada caso y se relacionará dicha información con la estructura molecular de estos compuestos.

Por lo tanto en el capítulo se seguirá la siguiente línea argumental: en primer lugar se abordará la discusión de las medidas LDI-TOF realizadas en hidrocarburos poliaromáticos modelo (PAHs), para evaluar la propensión que presentan estos compuestos a formar agregados en función del tamaño y la estructura del sistema de anillos de la molécula, y utilizar esta información en el análisis de los asfaltenos; la segunda parte del capítulo desarrollará la caracterización de las distribuciones de masas de asfaltenos procedentes del petróleo y el carbón, prestando especial atención a los fenómenos de agregación que experimentan en nuestras condiciones experimentales y cómo evitarlos, para poder determinar la masa promedio del monómero en cada caso. Apoyándonos en los resultados obtenidos se propondrá el modelo estructural que deben tener las moléculas de asfalto.

A lo largo de todo el estudio se han contrastado diferentes métodos de preparación de muestras, (*dried-droplet* y *solvent-free*), con el objetivo de analizar su influencia en los espectros de masas obtenidos en nuestras condiciones experimentales.

### 4.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos químicos constituidos por varios anillos aromáticos fusionados. Los anillos pueden estar constituidos por 4, 5, 6 o 7 átomos, si bien los más comunes son aquellos que contienen 5 o 6 átomos de carbono. La formación de PAHs de peso molecular progresivamente mayor puede tener lugar por diversas rutas. Pueden generarse estructuras resultantes de una ordenación lineal de los centros (“núcleos”) de los anillos o bien como consecuencia de una disposición “ramificada”. Así por ejemplo se obtendrían el antraceno y el fenantreno respectivamente a partir del naftaleno. También pueden adquirir conformaciones de tipo no lineal, más compactas, como es el caso por ejemplo del pireno o el coroneno. En general, para referirnos a la geometría de los anillos aromáticos en los PAHs, hablaremos de sistemas catacondensados, si no hay átomos de carbono comunes compartidos por tres anillos, o pericondensados, cuando tres anillos comparten átomos de carbono comunes, tal y como ilustra la figura 4.1.

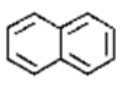
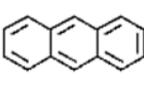
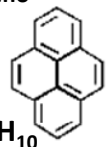

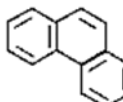
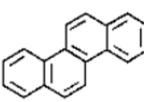
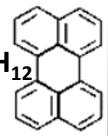
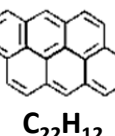
| Estructuras conformacionales típicas de los PAHs   |   |  |  |
|--|---|--|--|
| Sistemas catacondensados   |   | Sistemas pericondensados   |  |
| <b>Naftaleno</b><br><br>$C_{10}H_8$     | <b>Antraceno</b><br><br>$C_{14}H_{10}$ | <b>Pireno</b><br><br>$C_{16}H_{10}$   | <b>Coroneno</b><br><br>$C_{24}H_{12}$   |
| <b>Fenantreno</b><br><br>$C_{14}H_{10}$ | <b>Criseno</b><br><br>$C_{18}H_{12}$   | <b>Perileno</b><br><br>$C_{20}H_{12}$ | <b>Antantreno</b><br><br>$C_{22}H_{12}$ |

Figura 4.1: **Diferentes estructuras conformacionales típicas de los PAHs.** En el caso de los sistemas pericondensados se observa como al menos un átomo de carbono está compartido por tres anillos aromáticos.

Las moléculas aromáticas son capaces de interactuar entre sí para formar agregados supramoleculares. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  son de tipo dispersivo y se generan por el solapamiento intermo-

lecular de los orbitales conjugados, por lo tanto, serán más fuertes conforme aumente el número de electrones  $\pi$ . Como resultado, las moléculas poli-aromáticas tienden a autoensamblarse por apilamiento de orientación “cara a cara”, quedando los anillos enfrentados en planos paralelos. Diversos estudios teóricos se han centrado en el análisis de la formación de agregados de sistemas  $\pi$  [57] y en particular en las interacciones que se producen entre hidrocarburos poliaromáticos [58]. Para el caso de los hexabenzocoronenos, uno de los PAHs analizados en este estudio, cálculos teóricos prevén la formación de cristales líquidos con fases columnares estables [59]. En presencia de cadenas laterales o heteroátomos en los anillos pueden producirse otro tipo de interacciones de tipo no covalente, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones por transferencia de carga y las de tipo dipolo-dipolo.

En este proyecto hemos empleado técnicas de desorción/ionización láser para la caracterización de 13 hidrocarburos poliaromáticos de diferente tamaño y grado de pericondensación, cuya denominación, fórmula, peso molecular y estructura se detalla en la figura 4.2. Los hidrocarburos poliaromáticos seleccionados podemos clasificarlos en dos grupos en función de la presencia de heteroátomos y cadenas laterales en su estructura:

#### 1. PAHs sin heteroátomos ni cadenas laterales

- benzo(k)fluoranteno
- benzo(a)pireno
- perileno
- benzo(g,h,i)perileno
- dibenzo(a,h)antraceno
- coroneno
- hexabenzocoroneno

#### 2. PAHs que poseen heteroátomos y/o cadenas laterales

- pireno-butanol
- hexa-propil-hexabenzocoroneno
- dihidroxi-dibenzo(a,j)perileno-8,16-diona
- perileno-3,4,9,10-tetracarboxil-dianhidrida
- N,N ditridecil-perileno-tetracarboxil-di-imida

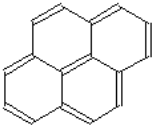
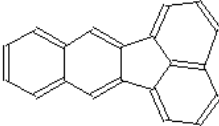
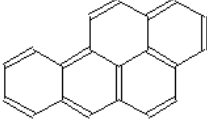
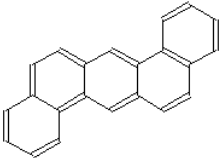
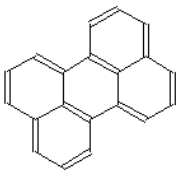
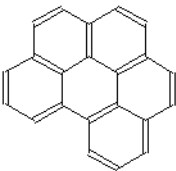
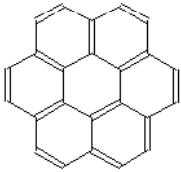
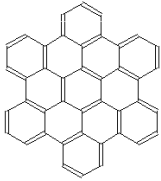

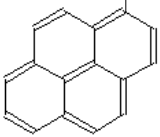
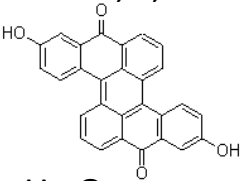
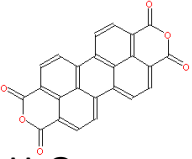
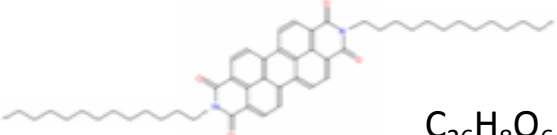
| Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)  |  |  |
|---|--|--|
| <b>PIRENO</b><br><br>$C_{10}H_8$ 202,3 g/mol   | <b>BENZO(K)FLUORANTENO</b><br><br>$C_{20}H_{12}$ 252,3 g/mol                            | <b>BENZO(A)PIRENO</b><br><br>$C_{20}H_{12}$ 252,3 g/mol                               |
| <b>DIBENZO(A,H)ANTRACENO</b><br><br>$C_{22}H_{14}$ 278,4 g/mol                           | <b>PERILENO</b><br><br>$C_{20}H_{12}$ 252,3 g/mol                                       | <b>BENZO(G,H,I)PERILENO</b><br><br>$C_{22}H_{12}$ 276,43g/mol                         |
| <b>CORONENO</b><br><br>$C_{24}H_{12}$ 300,4 g/mol                                      | <b>HEXA-BENZO-CORONENO</b><br><br>$C_{42}H_{18}$ 526,6 g/mol                          | <b>HEXA-PROPIL-HEXA-BENZO-CORONENO</b><br><br>$C_{60}H_{54}$ 775,1 g/mol            |
| <b>PIRENO-BUTANOL</b><br><br>$C_{20}H_{18}O$ 274 g/mol                                 | <b>DIHIDROXI-DIBENZO(A,J)PERILENO-8,16,DIONA</b><br><br>$C_{28}H_{14}O_4$ 414,4 g/mol | <b>3,4,9,10-PERILENO-TETRACARBOXIL-DIANIDRIDO</b><br><br>$C_{24}H_8O_6$ 392,3 g/mol |
| <b>N,N-DITRIDECIL-PERILENO-TETRACARBOXIL-DIIMIDA</b><br><br>$C_{26}H_{8}O_6$ 754 g/mol |  |  |

Figura 4.2: Denominación, fórmula, peso molecular y estructura de los hidrocarburos aromáticos analizados en este estudio.

La figura 4.3 muestra el espectro de absorban-  
cia de las especies estudiadas en la región del espec-  
tro relevante para nuestro estudio (220-450 nm.).  
Como puede observarse la mayoría de los PAHs se-  
leccionados presenta un pico de absorción de gran  
intensidad relativa en el intervalo de longitudes de  
onda comprendido entre 270 y 300 nm.

### 4.1.3. Asfaltenos

Los asfaltenos se definen como la fracción solu-  
ble en tolueno e insoluble en n-heptano o n-pentano  
procedente del petróleo y del carbón. Esta defi-  
nición operacional implica que el término genéri-  
co “asfalteno” incluya una mezcla polidispersa de  
compuestos derivados del carbono de naturaleza  
tanto aromática como alifática y con un contenido  
variable de heteroátomos en su composición (oxí-  
geno, nitrógeno, azufre, metales) [1, 5, 34, 60, 61].

La complejidad y heterogeneidad de los asfalte-  
nos ha supuesto un reto para las diversas técnicas  
analíticas empleadas en su estudio [15, 56, 62–78]  
y son responsables de una larga controversia acer-  
ca del potencial y las limitaciones de los diferen-  
tes métodos experimentales empleados para su ca-  
racterización [45]. Por una parte, la información  
estructural proporcionada por un amplio abanico  
de aproximaciones experimentales sugiere que los  
asfaltenos están constituidos predominantemente  
por un núcleo poliaromático conformado por has-  
ta diez anillos, con cadenas laterales alifáticas (mo-  
delo de ‘isla’) [61, 62, 76, 87, 90]. No obstante, esta  
asignación estructural ha sido puesta en duda en  
favor de un modelo de múltiples centros poliaro-  
máticos unidos por cadenas alifáticas (modelo de  
‘archipiélago’) [93]. Ambos modelos estructurales  
se muestran en la figura 4.4.

La razón de tal controversia reside en que se  
ha cuestionado la fiabilidad de las distribuciones  
de masas determinadas mediante técnicas analíti-  
cas diversas. De hecho, el intervalo de pesos mole-  
culares promedio propuesto por diferentes grupos  
difiere en varios órdenes de magnitud, oscilando  
entre menos de 1000 uma y alrededor de 100000  
uma [79]. En particular, las técnicas de desorción  
láser relevantes para nuestro proyecto han propor-  
cionado resultados que varían significativamente  
de unos grupos a otros, existiendo una clara dis-

crepancia entre las hipótesis propuestas por labo-  
ratorios independientes.

#### Asfaltenos. Estructuras moleculares modelo

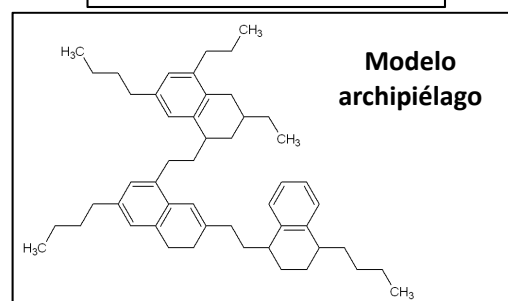
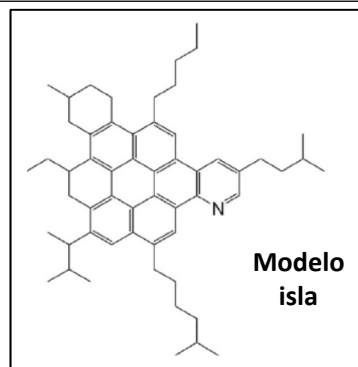


Figura 4.4: **Estructuras moleculares modelo de los asfaltenos. Modelo isla vs modelo archipiélago.** El modelo isla (panel superior) postula que las moléculas de asfalteno poseen un núcleo aromático policondensado de gran tamaño, con un sistema de entre cuatro y diez anillos fusionados. El modelo archipiélago (panel inferior) defiende la existencia de pequeños núcleos aromáticos unidos mediante cadenas alifáticas en la molécula.

Por un lado, una serie de grupos de investi-  
gación han publicado distribuciones de masas de  
asfaltenos con una mayor contribución en la zona  
de 300-1000 uma que resulta en pesos moleculares  
promedio en torno a las 500 uma e incluso inferio-  
res [5, 20, 55, 69–71]. Estos resultados son coheren-  
tes con los obtenidos mediante otros métodos de  
espectrometría de masas, tales como la desorción  
en plasma [74–77], la desorción por campo [32],  
la ionización química a presión atmosférica [5], la  
espectrometría por transformada de Fourier aco-  
plada a la ionización mediante electrospray [34] y  
la despolarización por fluorescencia [62, 63].



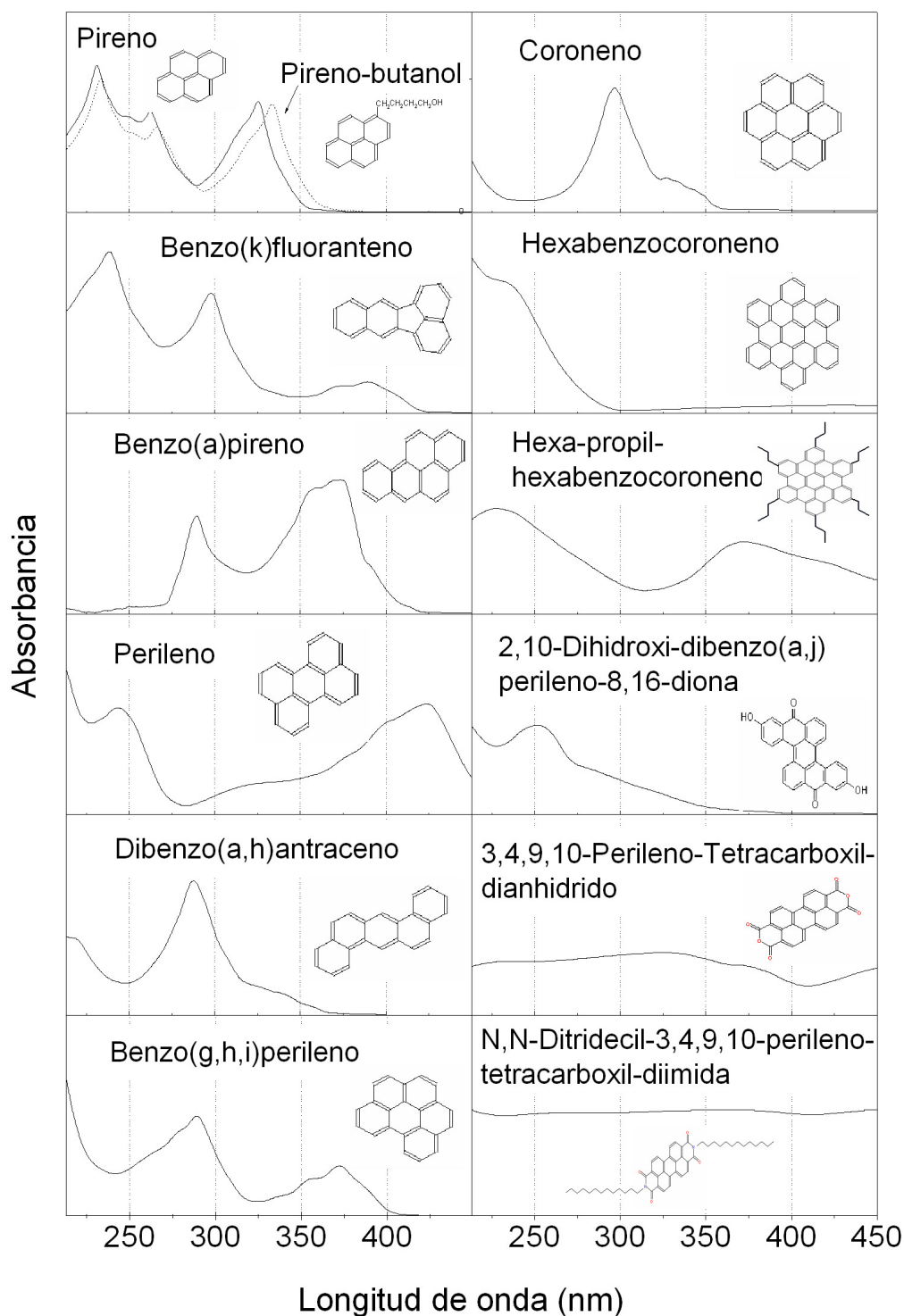


Figura 4.3: Espectros de absorbancia ultravioleta de los hidrocarburos poliaromáticos modelo considerados en este estudio. Los espectros se han registrado con un espectrofotómetro de fibra óptica CCD (DH2000, Ocean Optics) a partir de disoluciones de los PAHs en acetonitrilo. Los experimentos LDI se realizaron sintonizando el láser en el máximo de absorbancia en cada caso, dentro del intervalo comprendido entre 280 y 300 nm. En cada panel de la figura se muestra la estructura del PAH correspondiente.

Sin embargo existe también un número significativo de estudios LDI abordados por otros grupos que han concluido que los asfaltenos son considerablemente más pesados, presentando distribuciones de masas centradas en torno a 1500-2000 uma con colas que se extienden hasta varios miles de unidades de masa [56,66,67]. Estos resultados se apoyan en los obtenidos a partir de otras técnicas experimentales, tales como la osmometría de presión de vapor [66,72,77] y la cromatografía de exclusión en gel [23,67,68].

Estas discrepancias ponen en tela de juicio la fiabilidad de la desorción/ionización láser (LDI-MS) para la determinación de las distribuciones de masas de mezclas complejas de hidrocarburos. En un artículo publicado previamente por nuestro grupo [20] se argumentó que la controversia que existe alrededor de la fiabilidad de la determinación de la distribución de masas de los asfaltenos mediante la técnica LDI-MS radica en los fenómenos de agregación que tienen lugar en la pluma durante el proceso, un aspecto que ya se había apuntado en estudios anteriores [5,74].

Los asfaltenos experimentan fuertes atracciones intermoleculares como consecuencia de la interacción de los sistemas de electrones  $\pi$  de sus anillos aromáticos y los heteroátomos que los sustituyen, generándose una gran cantidad de complejos supramoleculares de tipo no covalente muy estables, que abarcan un amplio intervalo de masas [5,20,73,75,82–86]. Esta gran propensión a formar agregados es responsable de que la floculación sea una de las características que los definen.

Parámetros tales como la potencia láser utilizada —o más específicamente, la densidad de potencia aplicada por unidad de superficie— así como la concentración en superficie de los asfaltenos son parámetros que afectan de forma crucial a las distribuciones de masas obtenidas [20,49]. Y a menudo, ninguno de estos parámetros se controla de forma precisa, lo cual podría ser la causa de la disparidad de resultados registrados en la literatura.

La agregación que experimentan los asfaltenos en experimentos LDI también depende del número de anillos fusionados que conformen su estructura. Si el modelo de isla fuera dominante, los asfaltenos procedentes del carbón se distinguirían de los

que se obtienen a partir del petróleo por su distinta tendencia a agregar, ya que los primeros poseen sistemas de anillos de menor tamaño que los segundos. Si el modelo archipiélago dominara, no se esperaría una tendencia clara en la agregación al cambiar el peso molecular. La comparación de los espectros de absorción y fluorescencia ultravioleta-visible [87–89] y los ritmos de difusión [61,62,90] de los dos tipos de asfaltenos apoyan dichas diferencias estructurales, además de la observación directa de los mismos mediante microscopía de transmisión electrónica de alta resolución [91]. Mediante estudios de espectrometría de masas por transformada de Fourier acoplada con ionización mediante electronebulización [92], se ha corroborado el número de anillos promedio que conforman los asfaltenos procedentes del petróleo (siete). Sin embargo, estos métodos no permiten discernir si los anillos están fusionados o no.

A lo largo de este capítulo expondremos evidencias experimentales que apoyan el hecho de que los asfaltenos son moléculas relativamente pequeñas conjugando los resultados obtenidos en los análisis LDI de PAHs modelo y asfaltenos extraídos del petróleo (*Arabian light* (ALCO) —proporcionado por CEPSA— y un crudo obtenido del vertido del Prestige en la costa española (PREHCO)) y del carbón (Iino). La tendencia a la agregación observada en estos compuestos es más consistente con una estructura genérica de tipo isla que de tipo archipiélago.

La figura 4.5 muestra el espectro de absorbancia de los asfaltenos estudiados, ALCO (la absorbancia de PREHCO es muy similar) e Iino, e ilustra el hecho de que estas sustancias, de color negro o marrón oscuro, se caracterizan por tener una absorbancia óptica amplia en el intervalo del visible y el ultravioleta cercano debido a sus centros poliaromáticos [94]. Esta propiedad representa una ventaja sustancial para los análisis de espectrometría de masas acoplada con técnicas láser, porque permite la excitación electrónica resonante de las moléculas de asfalto, promoviendo su desorción e ionización, a una gran variedad de longitudes de onda y sin necesidad de añadir un cromóforo como matriz. Los experimentos LDI realizados emplearon pulsos láser de 266 nm, longitud de onda asociada a bandas de absorción del asfalto de gran intensidad relativa.

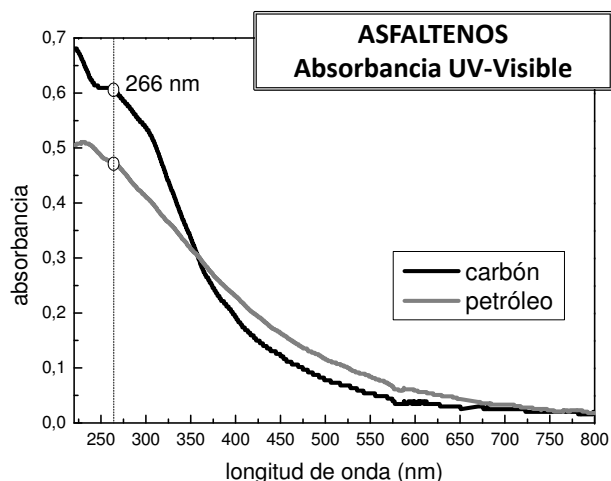


Figura 4.5: Espectros de absorción UV-visible del asfalteno ALCO, extraído del petróleo y el asfalteno lino, procedente del carbón. Los espectros se han medido sobre películas finas depositadas en una placa de cuarzo con un espectrofotómetro de fibra óptica CCD (DH2000, Ocean Optics). Los experimentos LDI de los asfaltenos se han realizado con radiación láser de 266 nm.

## 4.2. Análisis LDI-TOF de PAHs

Hemos realizado experimentos sistemáticos LDI en muestras monodispersas de los 13 hidrocarburos poliaromáticos relacionados en la figura 4.2. De esta manera, pretendemos racionalizar la marcada propensión a formar agregados que tienen los compuestos poliaromáticos e inferir la relación con su estructura. Pretendemos obtener información de distintos aspectos que pueden influir sobre la agregación supramolecular.

Por un lado consideraremos parámetros técnicos como la energía de los pulsos láser, la densidad de la pluma de desorción o las condiciones de extracción de iones.

Por otra parte estudiaremos propiedades moleculares como el tamaño y grado de pericondensación del sistema aromático, la presencia de heteroátomos o grupos polares y los efectos estéricos —los derivados de la presencia de cadenas laterales en la estructura—.

### 4.2.1. Aspectos Metodológicos

Los experimentos se realizaron sobre muestras preparadas mediante el método *solvent-free* y *dried-droplet*. En este último caso se prepararon disoluciones de 1000 ppm de los diferentes analitos en tolueno, depositándose sobre el portamuestras una pequeña cantidad para obtener una densidad promedio del analito de unos  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . También se llevaron a cabo análisis MALDI utilizando ditranol como matriz y radiación láser de 266 nm, obteniéndose los espectros de masas correspondientes a distintas proporciones molares analito:matriz (1:20, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500). Los experimentos LDI de los PAHs se llevaron a cabo sintonizando el láser en el máximo de absorción de cada compuesto, aplicando energías láser de entre 10 y  $70 \mu\text{J}/\text{pulso}$  y registrando los espectros de masas correspondientes cada  $10 \mu\text{J}$ . De forma paralela, se realizaron medidas adicionales a longitudes de onda de absorción más débil obteniéndose espectros de masas cualitativamente similares pero que requerían potencias láser mayores, lo que provoca la fragmentación apreciable de los iones padre y de sus agregados y constituye un efecto contraproducente en la investigación que nos ocupa.

### 4.2.2. Discusión de resultados

#### Agregación supramolecular (I). Efecto de la densidad de la pluma.

La figura 4.6 muestra los espectros LDI y MALDI correspondientes a muestras de coroneno preparadas mediante los métodos *dried-droplet* y *solvent-free*.

Los espectros LDI obtenidos en ambos casos son cualitativamente similares y, además del intenso pico del monómero —del ion padre—, se observan los correspondientes a sus agregados de entre 2 y 6 unidades. La intensidad de la señal de los agregados aumenta de forma significativa con la potencia del láser; por ejemplo, mientras que a energías láser de  $10 \mu\text{J}/\text{pulso}$  sólo se observa el dímero en el caso de la muestra más concentrada, preparada con el método *solvent-free*, pueden observarse fácilmente agregados de un mayor número

de unidades al emplear energías de 40  $\mu\text{J}$ /pulso en muestras preparadas con ambos métodos —y por tanto con diferente concentración—.

Las energías láser más altas también inducen una fragmentación apreciable, como puede observarse en el intervalo de masa bajas de los espectros ( $\leq 200$  uma), así como el ensanchamiento de los picos correspondientes a los agregados, especialmente en el caso de las muestras preparadas mediante *solvent-free*.

El aumento de la señal de los agregados que se observa a energías láser altas está directamente relacionado con la mayor densidad que se alcanza en la pluma de desorción, más que con variaciones en la eficiencia de ionización, como corroboran los experimentos MALDI que se describen a continuación.

En la parte inferior del panel de la figura 4.6 se representa el espectro MALDI del coroneno, en el cual el analito se diluyó en un factor de 500 en la matriz (ditranol), tanto en disolución con tolueno como en ausencia de disolvente. En ambos casos se observa como el proceso de agregación se suprime, debido a la reducción de la densidad del PAH en la pluma, siendo la señal procedente de los agregados inexistente, independientemente de la potencia láser utilizada o del retraso establecido entre la generación y la extracción de iones. Los picos de mayor intensidad relativa que aparecen en este caso, corresponden al ion padre del coroneno y al monómero y al dímero del ditranol.

La ausencia de agregados en el espectro MALDI de la muestra de coroneno y ditranol preparada mediante el método *solvent-free* llama particularmente la atención. A partir de esta observación se puede inferir que el material desorbido de una muestra granulada se disgrega de forma eficiente en monómeros en el proceso de desorción láser, para agregar nuevamente en la pluma cuando se alcanzan densidades del analito de interés lo suficientemente elevadas. Este resultado no tenía por qué esperarse, ya que la desorción directa de agregados desde las micropartículas producidas en el tratamiento de la muestra —se tritura en un mortero— constituye a priori un proceso probable.

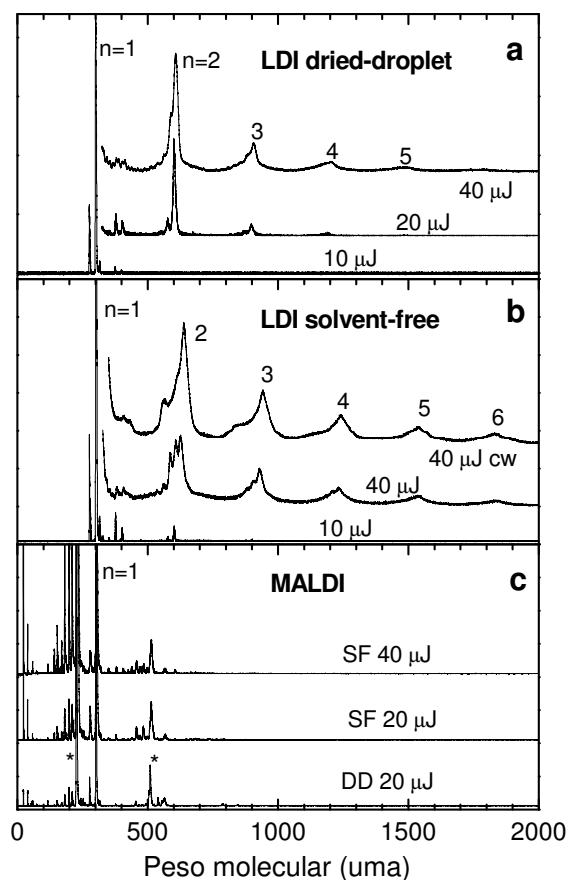


Figura 4.6: Espectros LDI/MALDI de muestras de coroneno preparadas mediante *dried-droplet* y *solvent-free*. a) Espectros LDI a 297 nm de muestras de coroneno de tipo *dried-droplet* (densidad superficial promedio de  $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ ); b) Espectros LDI análogos a los anteriores pero obtenidos a partir de coroneno puro (método *solvent-free*); c) Espectros MALDI a 266 nm de muestras de coroneno/ditranol (1:500) preparadas mediante *dried-droplet* y *solvent-free*. Las energías empleadas por pulso láser se indican junto a cada espectro. El monómero de coroneno (300.3 uma) se observa claramente en todos los espectros, así como sus agregados en determinados casos, pudiendo verse *clusters* de hasta 6 unidades. En los espectros MALDI del panel c) se observan picos adicionales asociados a la matriz (ditranol, 226 uma) y su dímero, denotados con asteriscos, pero no hay señal procedente de agregados de coroneno. Todos los espectros se registraron en condiciones de extracción pulsada de iones, excepto en el caso del espectro superior del panel b), en el que los iones se extrajeron de forma continua.

## Agregación supramolecular (II). Efecto de las condiciones de extracción de iones.

La formación de agregados también aumenta en condiciones de extracción continua de iones, como se ilustra en el panel b de la figura 4.6. Este efecto es consistente con la formación de agregados en la pluma y puede relacionarse con el hecho de que los iones formados en estadios tempranos durante el proceso de desorción actúen como núcleos para la formación de *clusters* al ser acelerados por el campo eléctrico para su extracción a través del entorno densamente poblado de la pluma de desorción, antes de que haya tenido lugar una expansión significativa.

Cuando se introducen retrasos temporales entre la generación y la extracción de los iones de cientos de nanosegundos (en nuestro caso, 1  $\mu$ s), los iones experimentan una co-expansión con la pluma e interaccionan con las moléculas (neutros e iones) vecinas en un proceso térmico. De acuerdo con los análisis realizados con los PAHs modelo, la aceleración rápida de los iones formados en estadios tempranos del proceso de desorción, resulta en fenómenos de agregación más eficientes.

## Agregación supramolecular (III). Efecto del tamaño y grado de pericondensación del sistema aromático.

Puesto que no existen diferencias cualitativas entre los espectros LDI de muestras preparadas mediante *solvent-free* o *dried-droplet* –siempre que haya una densidad promedio alta del analito en el portamuestras–, consideraremos en lo que sigue los espectros LDI de muestras preparadas mediante la técnica *solvent-free*. Además, todos los espectros representados se han obtenido en condiciones de extracción pulsada de iones debido a la mejor resolución en masas que se alcanza, aunque no se favorezca la formación de agregados como ocurre cuando no se aplican retrasos entre la generación y la extracción de los iones.

La figura 4.7 muestra los espectros LDI de ocho de los compuestos poliaromáticos estudiados en condiciones similares de potencia láser. Estos compuestos varían en el número de anillos y grado

de pericondensación: pireno y benzo(k)fluoranteno cuentan con 4 anillos, el benzo(a)pireno, perileno y dibenzo(a,h)antraceno con cinco anillos, el benzo(g,h,i)perileno posee seis anillos fusionados, y el coroneno y el hexabenzocoroneno (HBC-CO) son sistemas pericondensados de siete y 13 anillos fusionados, respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que la propensión a formar agregados de los hidrocarburos poliaromáticos aumenta al incrementar el número de anillos que conforma el sistema aromático. Esta tendencia está de acuerdo con las predicciones de estudios computacionales [58, 95].

En nuestros experimentos LDI observamos claramente la formación de agregados supramoleculares de diferente número de unidades que varían para las especies consideradas. Para sistemas de cuatro anillos los agregados poseen entre 2 y 4 unidades ( $n = 2 - 4$ ), en los de cinco anillos el número de unidades por *cluster* oscila entre 2 y 6, en el de seis anillos varía entre 2 y 7, en el de siete entre 2 y 8, y en el sistema de 13 anillos se observan agregados de hasta 11 unidades.

Se observa además que las señales de agregados más intensas y estructuradas se generan para las moléculas con mayor grado de pericondensación. Por ejemplo, hay mayor agregación en el benzo(a)pireno y en el perileno, en comparación con el dibenzo(a,h)antraceno –por relacionar PAHs del mismo número de anillos pero con diferente disposición–.

## Agregación supramolecular (IV). Efectos derivados de la presencia de heteroátomos y de cadenas laterales en la estructura poli-aromática.

Hemos seleccionado cinco PAHs modelo que poseen cadenas hidrocarbonadas laterales y/o heteroátomos y grupos polares como sustituyentes del carbono en el sistema de anillos (ver la figura 4.2), para su análisis mediante LDI-TOF de forma análoga a la descrita anteriormente. La figura 4.8 muestra los espectros LDI obtenidos.

Un resultado inmediato de este estudio fue la limitación en la energía máxima de los pulsos láser

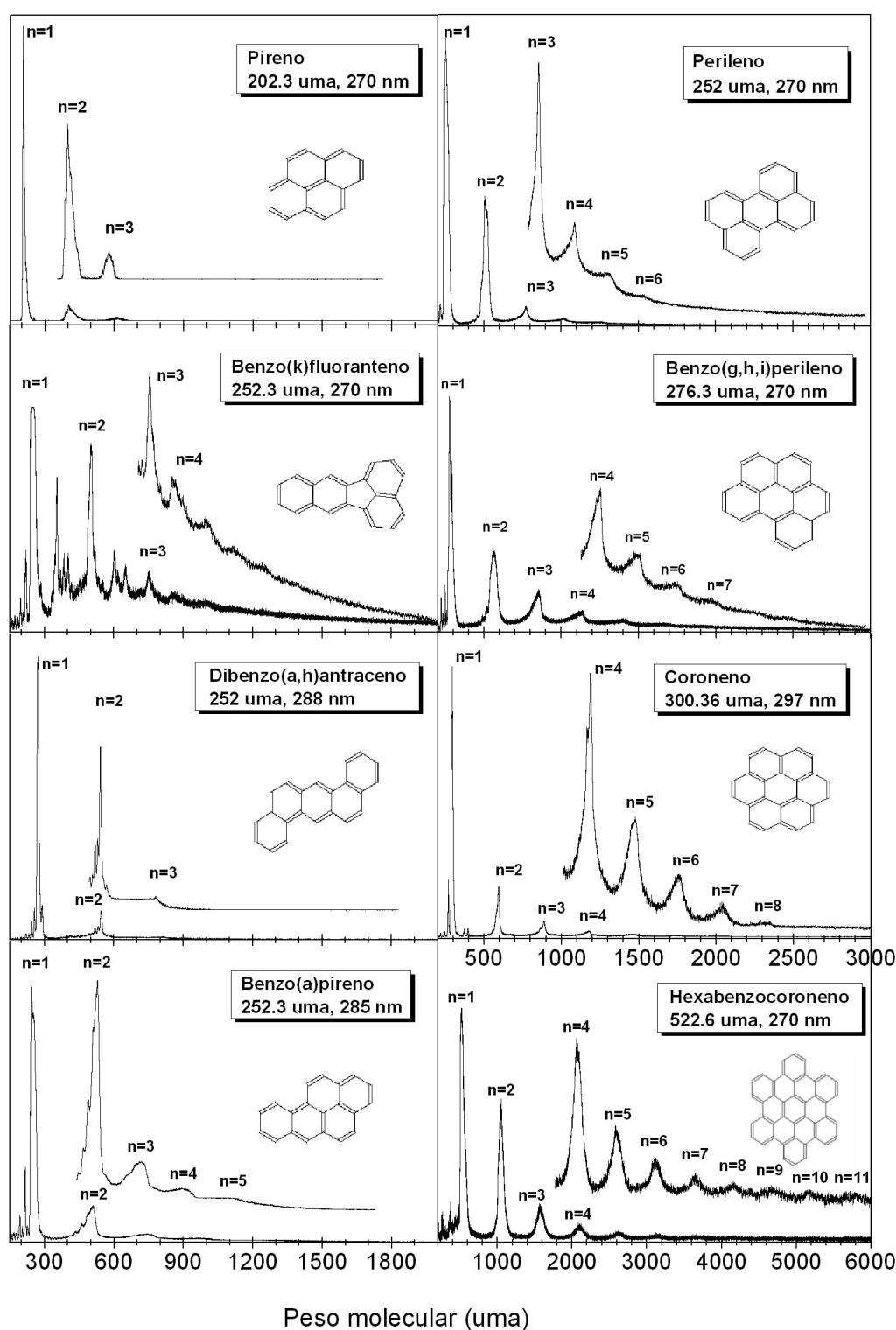


Figura 4.7: Espectros LDI de 8 de los hidrocarburos poliaromáticos modelo considerados en este estudio, que no poseen heteroátomos ni cadenas alifáticas laterales. Los espectros se han obtenido a partir de muestras preparadas mediante *dried-droplet* alcanzándose una densidad superficial de  $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ . En todos los casos se han aplicado energías de  $40 \mu\text{J}$  por pulso láser a las longitudes de onda indicadas en cada panel, que se corresponden con el máximo de absorción de cada molécula (ver figura 1). Todos los espectros se han obtenido en condiciones de extracción pulsada de iones.

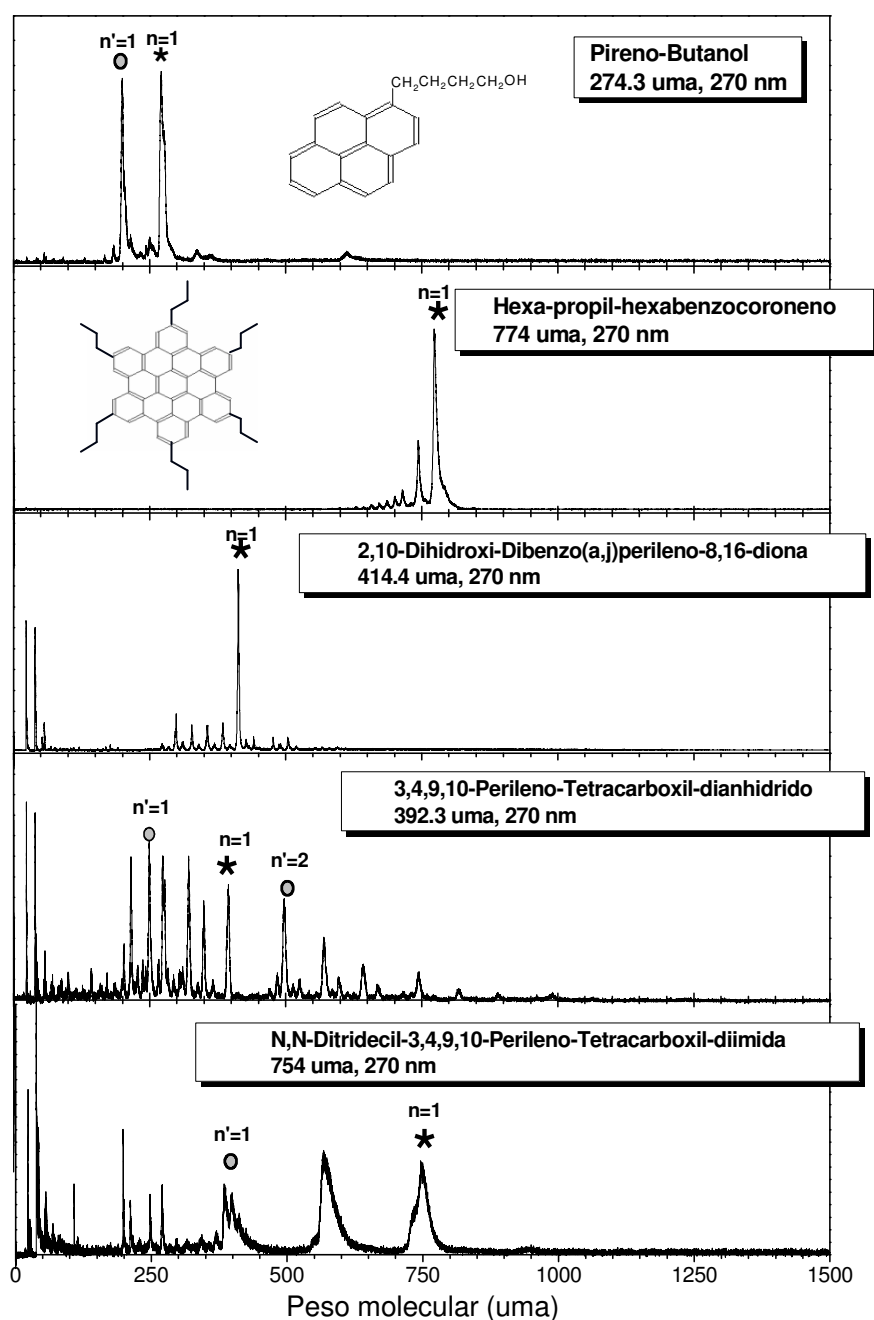


Figura 4.8: Espectros LDI de los 5 hidrocarburos poliaromáticos modelo considerados en este estudio, que poseen heteroátomos y cadenas alifáticas laterales. Los espectros se han obtenido a partir de muestras preparadas mediante *dried-droplet* alcanzándose una densidad superficial de  $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ . En todos los casos se han aplicado energías de  $40 \mu\text{J}$  por pulso láser a las longitudes de onda indicadas en cada panel, que se corresponden con el máximo de absorción de cada molécula (ver figura 1). Todos los espectros se han obtenido en condiciones de extracción pulsada de iones.

empleados para desorber e ionizar estos compuestos aromáticos. El motivo es la gran fragmentación molecular que se produce en el proceso LDI, especialmente a energías láser superiores a  $40 \mu\text{J}/\text{pulso}$ . La pérdida completa o progresiva tanto de los grupos polares como de las cadenas alifáticas laterales, genera una gran cantidad de iones de masas próximas entre sí que no se pueden asignar con la resolución en masas del equipo.

Un ejemplo claro es el espectro LDI del panel inferior (e) de la figura 4.8, correspondiente al análisis de la N,N ditridecil-perileno-tetracarboxil diimida. En este caso, el pico del ion padre (\*,  $n=1$ ) será la suma de los picos correspondientes a la desmetilación progresiva de las cadenas laterales y por eso se observa un pico ensanchado. En el caso del hexa-propil-hexabenzocoroneno también se observa de forma clara la pérdida gradual de los grupos propilo que forman parte de la molécula.

Es llamativo el hecho de que no se detecten sistemáticamente agregados en los espectros LDI de estos compuestos. Si bien las energías láser empleadas son menores que las utilizadas en los experimentos del apartado anterior, para los PAHs sin grupos polares ni cadenas alifáticas ya vimos que pulsos de  $\approx 20 \mu\text{J}$  son suficientes para inducir la formación de agredados.

Por ejemplo, en el caso del pireno, a  $30 \mu\text{J}/\text{pulso}$  se detecta claramente la señal del dímero y de forma débil la del trímero. Por el contrario, el pireno-butanol exhibe una menor tendencia a formar agregados. Asimismo, cabría esperar una agregación eficiente para el hexa-propil-hexabenzocoroneno a la vista de los resultados para el hexabenzocoroneno nativo. Esto no es sin embargo así; incluso aplicando energías láser muy superiores, del orden de  $100 \mu\text{J}/\text{pulso}$ , continúan sin generarse agregados estables de estos PAHs, dominando siempre los canales fragmentativos.

Parece deducirse de estas observaciones que tanto los heteroátomos como las cadenas laterales conducen a una supresión de los fenómenos de agregación. Esto se debe a que las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  se ven perturbadas por canales fotoquímicos fragmentativos y por efectos estéricos que impiden el apilamiento.

### 4.3. Análisis LDI-TOF de asfaltenos

Abordamos ahora el estudio de muestras de asfaltenos, siendo de esperar que experimenten pausas de agregación en el proceso LDI cualitativamente similares a las descritas en el caso de los PAHs modelo. Efectivamente, los experimentos que se discuten a continuación confirman que la agregación en la pluma puede llegar incluso a dominar el espectro de masas de los asfaltenos bajo condiciones favorables de concentración de la muestra y potencia láser. Estudiaremos estrategias para reducir estos efectos de agregación, de forma que la técnica LDI resulte útil para determinar la distribución de pesos moleculares de los asfaltenos. Consideraremos tres asfaltenos de origen distinto: dos de ellos extraídos de crudo de petróleo, uno de tipo *Arabian light* (ALCO), proporcionado por CEPESA, y otro de crudo procedente del vertido del Prestige en la costa española (PREHCO), y otro extraído de Carbón "Tanito Harum", proporcionado por el profesor M. Iino (Universidad Tohoku, Japón).

#### 4.3.1. Aspectos Metodológicos

El proceso que hay que seguir para la extracción de los asfaltenos ALCO y PREHCO del crudo de petróleo se describe de forma detallada en las referencias [15] y [20]. A grandes rasgos el procedimiento consta de varios pasos, siendo el primero de ellos la separación de las impurezas del crudo, tales como arcillas y otros sólidos, mediante centrifugación del crudo disuelto en tolueno (proporción 5:1 en volumen) a temperatura ambiente durante 30 minutos a 17000 rpm. El disolvente se eliminó posteriormente mediante evaporación natural. El petróleo libre de tolueno se mezcló con n-heptano (proporción 1:40 en volumen) para extraer los asfaltenos posteriormente mediante precipitación. La mezcla se tuvo en agitación durante 120 minutos antes de la decantación del asfaltino y la eliminación del sobrenadante. Este proceso se repitió de forma iterativa 12 veces hasta que el sobrenadante se volvió transparente. Los asfaltenos sólidos se dejaron en la campana extractora hasta la evaporación completa del disolvente. Como resultado final se obtuvo una muestra de asfaltino en forma de polvo marrón mate. El asfaltino Iino procedente del carbón se obtuvo como un extracto del carbón



“Tanito Harum” proporcionado por el profesor M. Iino (universidad de Tohoky, Japón).

Las muestras analizadas en el contexto de esta investigación se prepararon mediante los métodos *dried-droplet* y *solvent-free*. En el primer caso se prepararon disoluciones de asfaltenos en tolueno con concentraciones variables de entre 2 y 400 mg mL<sup>-1</sup>, depositando 20 µL en la superficie del portamuestras, dejando evaporar el disolvente al aire. En el segundo caso se machacaron los asfaltenos en un mortero hasta obtener un polvo fino, añadiendo la matriz a la mezcla en el caso de los experimentos MALDI. El polvo granulado homogéneo que se obtiene de esta manera se depositó en la superficie del portamuestras con la espátula. Finalmente se hizo pasar una corriente de aire por la superficie del portamuestras para eliminar el exceso de muestra y evitar la contaminación de la fuente de iones. En el caso de los experimentos MALDI, los asfaltenos se mezclaron con la matriz 2,4-DHB en una proporción molar 500:1, tomando como valor de referencia para calcular dicha proporción, el peso molecular promedio de los asfaltenos obtenidos de los experimentos LDI.

Para la realización de los experimentos que se detallan a continuación el equipo operó en condiciones tanto de extracción continua como de extracción pulsada de iones. Se emplearon pulsos láser de 266 nm procedentes del cuarto armónico de un Nd:YAG y también en el intervalo de 270 a 300 nm, procedentes del láser de colorante sintonizable en el UV. Las energías por pulso láser oscilan en un intervalo de 10 a 100 µJ/pulso. La resolución en masas promedio de los espectros obtenidos en el intervalo de masas de interés es de  $W/\Delta W \approx 200$ . El único tratamiento realizado a los datos obtenidos es el “suavizado” de las curvas, sin aplicar ninguna corrección de la línea base. En estudios previos, el equipo LDI/MALDI de fabricación propia ha superado con éxito las pruebas necesarias para garantizar su consistencia y robustez frente a los resultados obtenidos con dos equipos MALDI comerciales [20, 49]

### Análisis de datos

Las distribuciones de pesos moleculares de las muestras polidispersas de asfalto se determinarán a partir del ajuste de la distribución obteni-

da experimentalmente con una función log-normal empleada en estudios previos [20, 66]:

$$f(W) = \frac{N}{W} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\ln W - \ln W_0}{\sigma} \right)^2 \right]$$

donde  $W$  representa el peso molecular,  $W_0$  y  $\sigma$  son parámetros fijos que controlan la posición del máximo y de la anchura de la distribución, y  $N$  es una constante de normalización. Con este tratamiento asumimos que todas las especies tienen carga simple, algo típico en LDI, por lo que la relación masa/carga observada en los espectros obtenidos mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo se tomará como el peso molecular de los analitos. En la referencia [20] pueden encontrarse más detalles técnicos del procedimiento de ajuste, en particular, los relacionados con la transformación de los tiempos de vuelo en masas.

### 4.3.2. Discusión de resultados

En este punto discutiremos en primer lugar los efectos de agregación que experimentan los asfaltenos en los experimentos LDI/MALDI-TOF y como influyen parámetros experimentales, tales como la concentración de las muestras o el modo de extracción iónica en las distribuciones de masas que se obtienen. En segundo lugar abordaremos distintas estrategias que pueden utilizarse para inhibir la agregación en este tipo de compuestos en nuestras condiciones experimentales. Por último se expondrá el comportamiento de los asfaltenos extraídos del carbón.

Comenzaremos por tanto exponiendo los resultados de experimentos que se utilizarán como referencia para proporcionar una primera aproximación general y cualitativa al comportamiento observado en los dos asfaltenos extraídos del petróleo considerados en este estudio. Las figuras 4.9, 4.10 y 4.11 ilustran las distribuciones de masas obtenidas en nuestras condiciones experimentales y como afectan diversos parámetros experimentales a la formación de agregados.

La figura 4.9 compara los espectros LDI obtenidos a partir de muestras preparadas mediante *dried-droplet* con diferente concentración en super-

ficie: 1 y 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , del asfalto ALCO tras la evaporación del disolvente. Los espectros están registrados en condiciones de extracción pulsada de iones. Se presentan los espectros LDI realizados a dos energías representativas distintas (40 y 80  $\mu\text{J}/\text{pulso}$ ) de los pulsos láser de 266 nm empleados para la desorción e ionización de las muestras.

De las medidas realizadas con la energía láser más baja se obtienen distribuciones de masas cuyo máximo se sitúa entre 300 y 600 uma, con colas cuya intensidad relativa decrece lentamente, extendiéndose hacia masas altas. El incremento de la potencia láser provoca un aumento de la señal asociada con los componentes más pesados. Tal aumento es más pronunciado en muestras de mayor densidad produciéndose un desplazamiento del máximo de la distribución hacia  $\approx 1500$  uma y detectándose una corriente de iones significativa hasta masas superiores a las 3000 uma.

La figura 4.10 muestra espectros LDI-TOF del asfalto PREHCO obtenidos en condiciones de extracción pulsada y continua de iones, a partir de muestras de igual concentración: 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , preparadas mediante *dried-droplet*. El comportamiento que exhibe el asfalto PREHCO es cualitativamente análogo al descrito para el asfalto ALCO en relación a las diferencias que se aprecian al variar la potencia láser empleada. Al operar en condiciones de extracción continua de iones se observa un aumento de la contribución de componentes más pesados en los espectros LDI, que es más notable en el caso del espectro obtenido con una potencia láser más alta.

En resumen, el conjunto de medidas LDI presentadas en las figuras 4.9 y 4.10 indica que las distribuciones de masas registradas para los asfaltenos están condicionadas tanto por la muestra como por las condiciones experimentales. En particular, la intensidad de la señal procedente de las especies más pesadas aumenta (i) cuando se utilizan muestras densas, (ii) se emplean potencias láser elevadas y (iii) se opera en condiciones de extracción continua de iones.

Estas observaciones son consistentes con los resultados descritos en este capítulo para los PAHs y con los recogidos en una publicación previa del grupo sobre el asfalto ALCO [20].

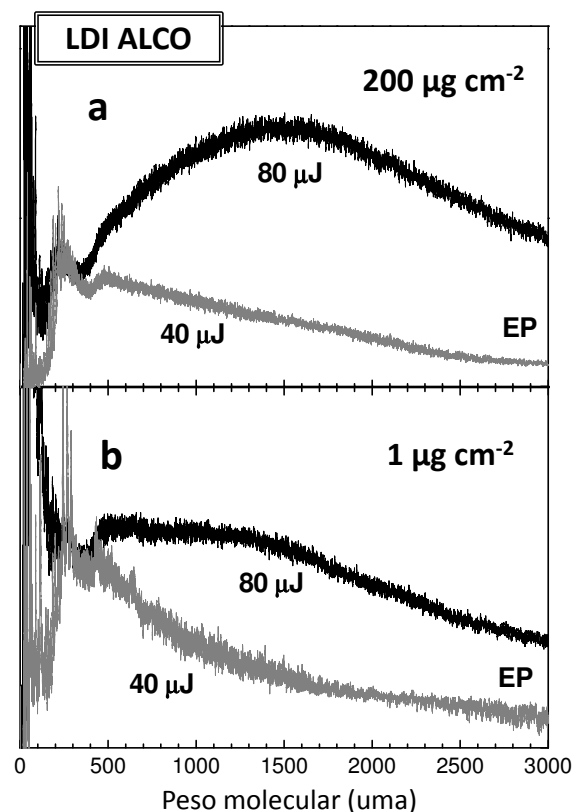


Figura 4.9: Espectros LDI del asfalto Arabian Light (ALCO) obtenidos a partir de muestras preparadas mediante el método *dried-droplet* con distinta densidad superficial promedio. Panel a) 200  $\mu\text{g cm}^{-2}$  y panel b) 1  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Se muestran espectros medidos en condición de extracción pulsada de iones con energías por pulso láser de 266 nm de 40 y 80  $\mu\text{J}$ . El aumento de la corriente de iones detectada en pesos moleculares superiores a las 1000 uma es indicativo del acusado fenómeno de agregación que experimentan los asfaltenos en el proceso de desorción/ionización láser.

De modo que esta investigación corrobora la conclusión presentada en dicha publicación, en la que se postula que los efectos de agregación en la pluma provocan desplazamientos del máximo de las distribuciones de pesos moleculares de los asfaltenos hacia masas más altas al aumentar la concentración de la muestra y la energía del láser. Además, el operar en condiciones de extracción continua de iones tiene un efecto beneficioso en la detección de productos de elevado peso molecular.

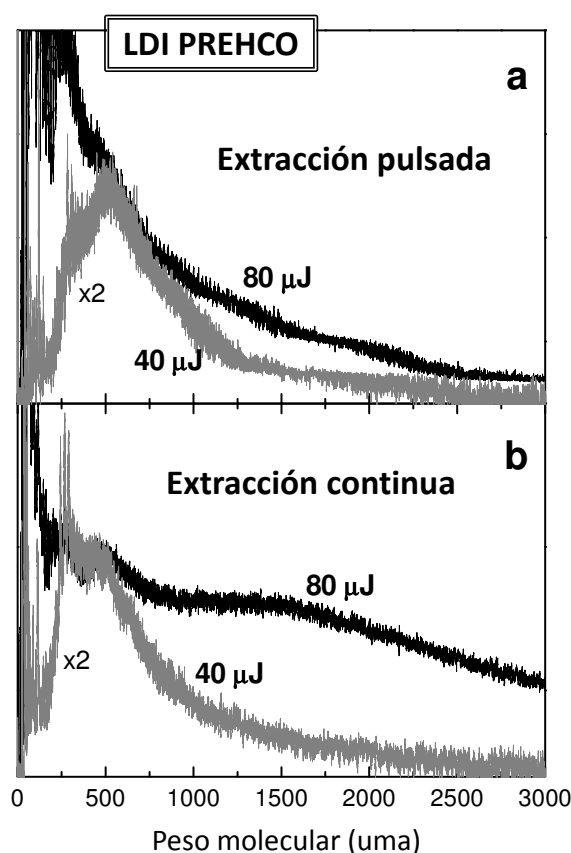


Figura 4.10: Espectros LDI del asfalto PREHCO obtenidos en modo de extracción pulsada (a) y continua (b) de iones. Muestras preparadas mediante el método *dried-droplet* con densidad superficial promedio de  $1 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Se muestran espectros medidos en condición de extracción continua y pulsada de iones con energías por pulso láser de 40 y  $80 \mu\text{J}$ . Los espectros obtenidos con menor energía por pulso láser se han representado empleando un factor de corrección indicado en cada caso para su correcta visualización.

Probablemente, la causa de dicho efecto será la aceleración que experimentan los iones de asfalto a través del entorno densamente poblado de la pluma en los primeros estadios del proceso de desorción. Y este efecto también es consistente con la hipótesis de que la agregación de estas especies ocurre predominantemente en la pluma. En la referencia [20] también se afirmó que los efectos de agregación que tienen lugar en los experimentos

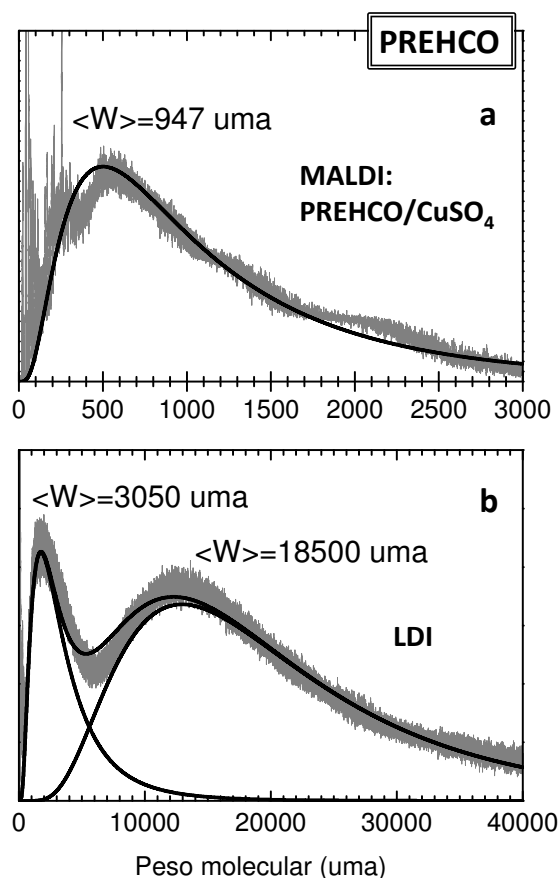


Figura 4.11: Espectros MALDI (panel a) y LDI (panel b) del asfalto PREHCO. El espectro MALDI (a) se ha medido en muestras del asfalto diluido con la sal  $\text{CuSO}_4$ , obteniendo una densidad superficial promedio del orden de  $\approx 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$ . Se ha empleado radiación láser de 266 nm y energías por pulso de  $40 \mu\text{J}$ . Los iones se han extraído empleando la fuente pulsada. El espectro LDI (b) del asfalto PREHCO se ha obtenido empleando radiación láser de 266 nm y energía por pulso de  $80 \mu\text{J}$ , enfocando el haz láser en las zonas del portamuestras en las que se observa un acúmulo de asfalto en forma de traza marrón oscuro. El espectrómetro de masas operó en condiciones de extracción continua de iones y en modo “reflectron”. Los espectros de masas obtenidos en ambos casos (paneles a y b) se han ajustado utilizando la distribución log-normal introducida al principio de este capítulo. Los pesos moleculares promedio asociados a cada curva de ajuste se indican en cada caso. En el caso del panel b, cada una de las bandas se ha ajustado de forma independiente.

LDI serían los responsables de la inconsistencia en

las medidas de las distribuciones de masas de los asfaltenos publicadas por diferentes grupos de investigación, con máximos situados en torno a 300-700 uma [5, 20, 55, 69–71] o bien alrededor de masas más altas (2000 uma) [56, 66, 67]. Esto también estaría de acuerdo con las conclusiones de comparaciones sistemáticas entre distribuciones de masas de asfaltenos obtenidas previamente con diferentes técnicas analíticas [74].

A continuación discutiremos los resultados obtenidos del análisis LDI de muestras de asfalto extremadamente densas y exploraremos los agregados de elevado peso molecular que se forman durante el proceso.

El panel inferior (b) de la figura 4.11 representa las medidas realizadas en condiciones que favorecen la agregación de los asfaltenos: con alta potencia láser (80  $\mu\text{J}/\text{pulso}$ ), enfocando el haz en regiones densas de muestras muy concentradas (200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y aplicando el campo de extracción de los iones de forma continua.

En este caso se obtienen distribuciones de masas bimodales, en las cuales la primera banda localizada alrededor de las 1000-2000 uma parece análoga a las descritas previamente. La segunda banda, que detectamos de forma sistemática en el intervalo de 5000-30000 uma, y que corresponde a componentes muy pesados —con un peso molecular promedio de 15000 uma en todos los casos— constituye una aportación sorprendente con respecto a las medidas realizadas en muestras menos densas. Esta segunda banda se detectó con gran sensibilidad con el espectrómetro de masas operando en modo *reflectrón*.

En otros experimentos LDI [20, 23], ESI [65] y de cromatografía de gases [73] se han obtenido distribuciones bimodales parecidas a las medidas en nuestra investigación. La observación de este tipo de distribuciones de masas nos indica que se está produciendo la formación de agregados específicos de moléculas de asfalto. La banda de *clusters* más pesados ( $\geq 5000$  uma) puede relacionarse con el acoplamiento de agregados estables de asfaltenos más ligeros. El mecanismo alternativo de agregación inespecífica en el que los monómeros de asfalto se incorporarían de forma gradual a los *clusters* parece ser menos eficiente, ya que experi-

mentalmente daría lugar a un ensanchamiento progresivo y a un desplazamiento de la distribución de masas, en lugar de la aparición de una distribución de masas que puede diferenciarse nítidamente de la primera banda. Esta última, acumula la contribución de los agregados más ligeros, que se detectan relativamente rápido en muestras de asfalto de densidades moderadas y con energías láser no muy altas. Estas conclusiones sugieren que la evolución desde el monómero de asfalto —molécula unida mediante enlace covalente— hacia agregados que contienen un número cada vez mayor de unidades, tiene lugar en un proceso jerárquico mediante la estabilización de agregados de tamaño creciente, que provocan la formación de disposiciones nanométricas, que forman los cimientos para las estructuras más pesadas.

### Optimización del método de preparación de muestras y caracterización fiable de la distribución de masas de los asfaltenos

Una vez que hemos expuesto el comportamiento que exhiben los asfaltenos del petróleo ALCO y PREHCO en nuestras condiciones experimentales, desarrollaremos el argumento de que el uso de energías láser distintas o el análisis de zonas de la muestra con diferentes densidades de material puede provocar la aparente inconsistencia entre los espectros LDI de asfaltenos publicados por diferentes grupos.

Por tanto, la cuestión principal sería perfilar los procedimientos apropiados que habría que seguir en la realización de los análisis LDI, para que proporcionen una determinación certera de la distribución de masas de las moléculas de asfalto unidas mediante enlace covalente. A la vista de los resultados descritos previamente podemos afirmar que sería conveniente (i) emplear muestras con bajas densidades de asfalto, (ii) potencias láser igualmente bajas y (iii) operar en condiciones de extracción pulsada de iones.

Con respecto a la primera recomendación que se apunta en el párrafo anterior para conseguir espectros LDI fiables en el análisis de asfaltenos, es importante señalar que la preparación de muestras de concentración homogénea en toda la superficie del portamuestras no es factible al emplear

el método convencional de co-precipitación (*dried-droplet*), incluso partiendo de disoluciones de asfalto de muy baja concentración. Esto es debido, tal y como se argumentó en detalle en el capítulo 2, a que durante la evaporación del disolvente los asfaltenos no precipitan de forma homogénea y tienden a acumularse en zonas concretas del portamuestras, aumentando la densidad en estos dominios hasta tal punto, que incluso llegan a observarse claramente acúmulos marrón oscuro [26].

Las densidades promedio que se han indicado antes para las muestras de asfalto preparadas mediante *dried-droplet* deben considerarse como meros parámetros de referencia, que evidentemente no representan las densidades locales reales de la muestra en las regiones en las que incide el haz láser. Es más, en un experimento LDI típico se intentaría enfocar el láser precisamente en estas regiones de alta densidad de analito ya que proporcionan los llamados *sweet spots*, zonas del material que al ser irradiadas con el láser producen una señal iónica absoluta muy alta. Y de hecho, la alta concentración de la muestra en estas zonas constituye un entorno especialmente apropiado para la producción de agregados de asfaltenos de elevado peso molecular tal y como se mostró en la referencia [20]. En ese artículo se comenta que en los espectros LDI obtenidos a partir de zonas de la muestra de elevada densidad, aparecía una banda ancha en el espectro de masas centrada alrededor de 10000 uma que se extendía hasta las 20000 uma.

En el contexto de la investigación que nos ocupa se probaron varios métodos de preparación de muestras para tratar de producir muestras de asfalto con una distribución de densidad homogénea en toda la superficie del portamuestras de forma controlada.

Una propuesta especialmente fructífera surgió de la transferencia de películas ultrafinas de asfalto —en ausencia de disolvente—, preparadas en la interfase aire/agua. En la figura 4.12 se representan series de espectros LDI registrados a partir de dos películas de asfalto PREHCO diferentes. Por un lado, se preparó una película de asfalto homogénea de baja densidad ( $0.36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) mediante la deposición de asfaltenos en la interfase desde una disolución de los mismos en tolueno con una concentración de 0.1 mg/mL. Por otro lado,

se elaboró una segunda película de asfaltenos con gran presencia de flóculos, formada a partir de la deposición en la interfase de una disolución de asfalto más concentrada (4 mg/mL) que la anterior. La estructura microscópica de esta última película muestra una alternancia irregular de dominios con una concentración de asfaltenos reducida y con una gran densidad local de material.

Para cada película se registraron espectros LDI medidos con energías láser que oscilan entre 40 y 90  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  obtenidos con radiación láser de 266 nm. Tales medidas reflejan claramente el comportamiento distinto de los dos tipos de películas en nuestras condiciones experimentales.

Los espectros procedentes de películas irregulares muestran una dependencia significativa de la energía láser empleada en el experimento. A energías láser bajas las distribuciones obtenidas presentan máximos en la zona de masas bajas del espectro, mientras que al emplear energías láser más elevadas, aparecen distribuciones más anchas centradas en 1500-2000 uma que dominan el espectro de masas. Esta producción de agregados de asfalto surge de los dominios alternos de diferente densidad que hay en la muestra, asociados a la agregación mesoscópica de los asfaltenos.

Es interesante observar el comportamiento que exhibe la película de baja densidad homogénea, ya que en este caso, el incremento de la energía del láser afecta exclusivamente al valor absoluto de la corriente de iones detectada pero no a la forma de la distribución de masas obtenida, por lo que los espectros LDI registrados a 40, 65 y 90  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  muestran distribuciones similares centradas en  $\approx 500$  uma. En este punto hay que resaltar el hecho de que estos experimentos se realizaron en condiciones de extracción continua de iones, y aún así, el peso molecular promedio que se obtiene para los asfaltenos es inferior a 1000 uma.

También se realizaron otros intentos para conseguir muestras de asfalto de baja densidad utilizando métodos estándar, basados en la disolución de los asfaltenos con diferentes matrices y sales, tanto en disolución (*dried-droplet*) como en ausencia de disolvente (*solvent-free*). En la publicación previa de nuestro grupo [20], a la que ya se ha hecho referencia varias veces a lo largo de este ca-

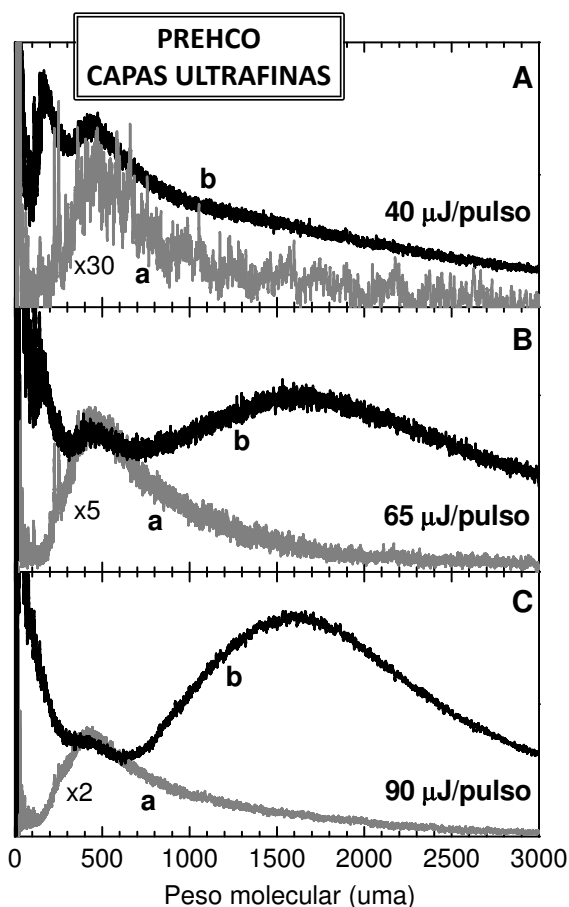


Figura 4.12: Espectros LDI del asfalto PREHCO medidos sobre muestras obtenidas a partir de la transferencia de películas finas preparadas en la interfase aire/agua. Se ha empleado radiación láser de 266 nm a las energías indicadas en cada panel. Las curvas denotadas como “a” corresponden a muestras de películas homogéneas de baja densidad ( $0.36 \mu\text{g cm}^{-2}$ ); las curvas denotadas como “b” corresponden a películas irregulares de tipo isla en las cuales hay presencia de agregados de asfalto a escala mesoscópica (ver el texto para mayor detalle). La intensidad relativa de los espectros LDI de películas homogéneas se ha corregido aplicando un factor que se indica en cada caso para facilitar su comparación directa con las curvas asociadas a muestras en las que hay presencia de agregados.

pítulo, se mostró que la dilución del asfalto en la matriz 2,5-DHB suprimía los efectos de agregación de forma eficiente, de un modo similar a lo descrito más arriba en el caso de las películas de baja densidad transferidas desde la interfase aire/agua

al portamuestras.

En la presente investigación se profundiza en estos intentos de dilución del asfalto, empleando ditranol y tetracianoquinodimetano (TCNQ) como matrices y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ). Las dos matrices mencionadas se han propuesto como compuestos fiables para la realización de experimentos MALDI de especies derivadas del carbono [26]. La sal  $\text{CuSO}_4$  se utilizó con el objetivo de examinar la robustez del método MALDI frente a la carga iónica en el contexto de esta investigación, y para comprobar si la cationización del asfalto mejora la señal iónica. Además, la sal tiene la ventaja con respecto a las matrices orgánicas, de que no introduce ruido de fondo en el intervalo de masas comprendido entre 100 y 300 uma, a la vez que diluye al asfalto en la muestra.

La figura 4.13 muestra una selección de los espectros MALDI obtenidos con diferentes matrices a dos energías láser distintas (40 y 80  $\mu\text{J/pulso}$ ). En todos los casos se obtienen distribuciones de asfalto con máximos localizados en torno a 500 uma que son prácticamente independientes de la energía láser empleada, salvo en el intervalo de masas inferior a 300 uma, donde se detecta la señal procedente de los iones de la matriz y los fragmentos de asfalto. Como esperábamos, esta señal es menor en el caso de las muestras diluidas con  $\text{CuSO}_4$ .

Los espectros LDI obtenidos de muestras de asfalto y ditranol preparadas mediante *dried-droplet* (paneles a y b de la figura 4.13) muestran que los efectos de agregación se vuelven despreciables incluso en condiciones de extracción continua de iones. Las medidas en estas muestras se realizaron a 266 y 280 nm —aunque sólo se muestran las primeras—. Esta última longitud de onda corresponde al máximo de absorbancia de una de las bandas de absorción ultravioleta del ditranol. En ambos casos no se apreciaron diferencias en los espectros LDI obtenidos.

Los espectros MALDI de muestras *solvent-free* de asfalto/TCNQ y asfalto/ $\text{CuSO}_4$  se obtuvieron utilizando radiación láser de 266 nm, longitud de onda a la que tanto el TCNQ como la sal presentan una absorbancia relativa bastante débil, en comparación con la del asfalto.

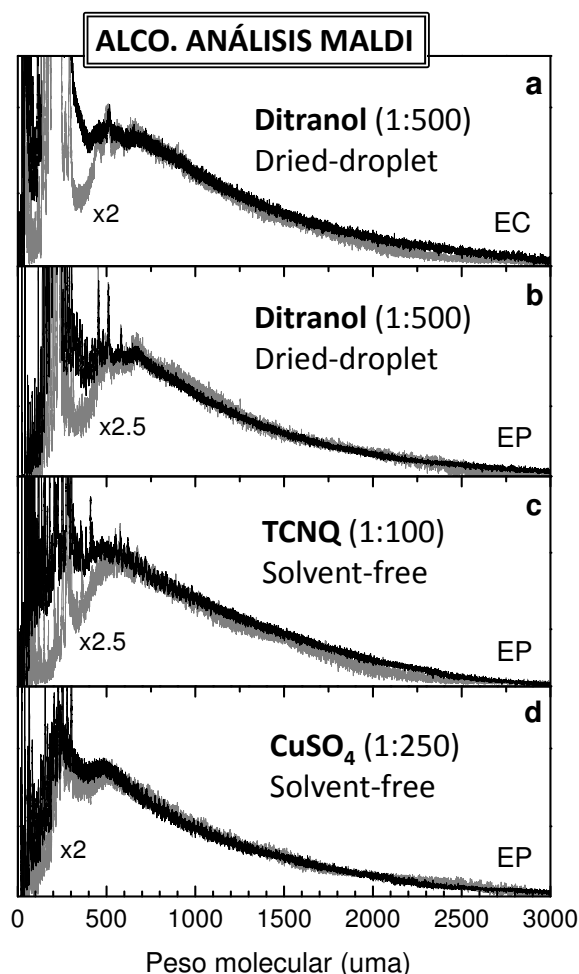


Figura 4.13: **Espectros MALDI del asfalto ALCO** diluido en la matriz ditranol (método *dried-droplet*, paneles a y b), en la matriz TCNQ (método *solvent-free*, panel c) y la sal  $\text{CuSO}_4$  (método *solvent-free*, panel d). La densidad superficial promedio es en todos los casos del orden de  $\approx 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$ . Se muestran espectros obtenidos en condiciones de extracción continua y pulsada de iones con radiación de 266 nm y energías por pulso láser de 40 y 80  $\mu\text{J}$ , indicadas en cada curva. Los espectros obtenidos a menor energía se han corregido con el factor indicado en cada caso para aumentar su intensidad relativa y facilitar su comparación directa con los de mayor energía.

En todos los casos se obtuvieron espectros similares y los cambios en el valor absoluto de la corriente de iones pueden atribuirse a variaciones en el grado de dilución local de la muestra de asfalto en la región en la que incide el haz láser.

En el panel superior (a) de la figura 4.11 podemos observar la distribución MALDI obtenida a partir de muestras de asfalto PREHCO con  $\text{CuSO}_4$  preparadas en ausencia de disolvente. El espectro es análogo al obtenido al diluir el asfalto ALCO con la misma sal (ver panel d de la figura 4.13). La distribución de masas presenta un máximo en torno a 500 uma y decrece lentamente extendiéndose hasta las 3000 uma. Los espectros se han ajustado a la distribución log-normal introducida al principio de este capítulo. El ajuste proporciona un peso molecular promedio de alrededor de 900 uma.

Nuestros resultados indican que para las matrices empleadas, la mejora del mecanismo de desorción/ionización es comparable con los efectos de tipo *self-matrix* que conducen el proceso de desorción en muestras de asfalto puras. El aspecto más relevante del uso de la técnica MALDI es por tanto la dilución eficiente de los asfaltenos con la matriz. Además de las muestras preparadas mediante co-precipitación y en ausencia de disolvente, se obtienen espectros MALDI similares empleando como matrices tanto el ditranol como el TCNQ.

La muestra de asfalto y  $\text{CuSO}_4$  se preparó únicamente con el método *solvent-free* puesto que no se disponía de un disolvente apropiado para ambas especies. También se analizaron muestras de asfalto puro preparadas en ausencia de disolvente, de las que resultaron espectros LDI similares a los obtenidos a partir de muestras concentradas preparadas mediante *dried-droplet* y que se representan en la figura 4.9, aunque en general, el método *solvent-free* da lugar a una mayor fragmentación.

En el momento en el que se publicó el artículo en el que se basa este capítulo no teníamos conocimiento de la existencia de otras publicaciones en las que se presentaran espectros LDI de asfaltenos obtenidos de muestras preparadas mediante el método *solvent-free*, aunque dicho método sí que se había empleado con éxito en el análisis de otras especies derivadas del carbono [26], moléculas poliaromáticas de gran tamaño y otros compuestos de elevado peso molecular [17, 25]. Nuestra experiencia confirma que el método es robusto y relativamente simple de implementar y podría ayudar en investigaciones futuras en el análisis de asfaltenos

con matrices de distinta polaridad.

Es de resaltar que la coincidencia de las distribuciones del monómero de asfaltano registradas en los experimentos LDI y MALDI, a partir de muestras preparadas con la técnica *dried-droplet* y *solvent-free* y el análisis de películas delgadas apoya un escenario en el cual la dinámica de la pluma emerge como el principal mecanismo para la formación de agregados de asfaltano. Otros procesos alternativos, como la desorción directa de agregados desde la muestra, parecen tener una menor relevancia en nuestras condiciones experimentales. Y este fenómeno es llamativo sobre todo en los experimentos realizados en ausencia de disolvente, sobre muestras de asfaltano en polvo, en los cuales el material desorbido parece romperse de forma eficiente en los monómeros de asfaltano. Esto concuerda con el efecto similar que se observa en el caso de los PAHs modelo, descrito anteriormente en este capítulo.

Por último, abordaremos la caracterización de las distribuciones de masas obtenidas a partir de asfaltenos extraídos del carbón. La figura 4.14 muestra espectros LDI del asfaltano lino obtenidos de muestras preparadas mediante el método *dried-droplet*, a partir de disoluciones del asfaltano en tolueno de concentración 2 ppm (panel a) y 400 ppm (paneles b y c), y mediante *solvent-free* (panel d). Todos los espectros se han obtenido aplicando radiación láser de 266nm. La figura ilustra el hecho de que este tipo de asfaltenos se comporta de forma similar a la expuesta anteriormente para los asfaltenos obtenidos del petróleo.

Así, en muestras lo suficientemente diluidas del asfaltano lino (panel a, *dried-droplet* 2 ppm) se evita la agregación del mismo, obteniéndose distribuciones de masas relativamente estrechas y centradas en torno a 300 uma, con colas que se extienden hasta las 500 uma aproximadamente. Esta distribución debe de parecerse bastante a la del monómero del asfaltano lino.

Al aumentar la concentración, aumenta la presencia de agregados en los espectros de masas obtenidos, tal y como muestran los paneles b, c y d de la figura 4.14, en los que aparece una banda adicional en el espectro de masas, centrada alrededor de las 600-700 uma, y que se extiende por encima

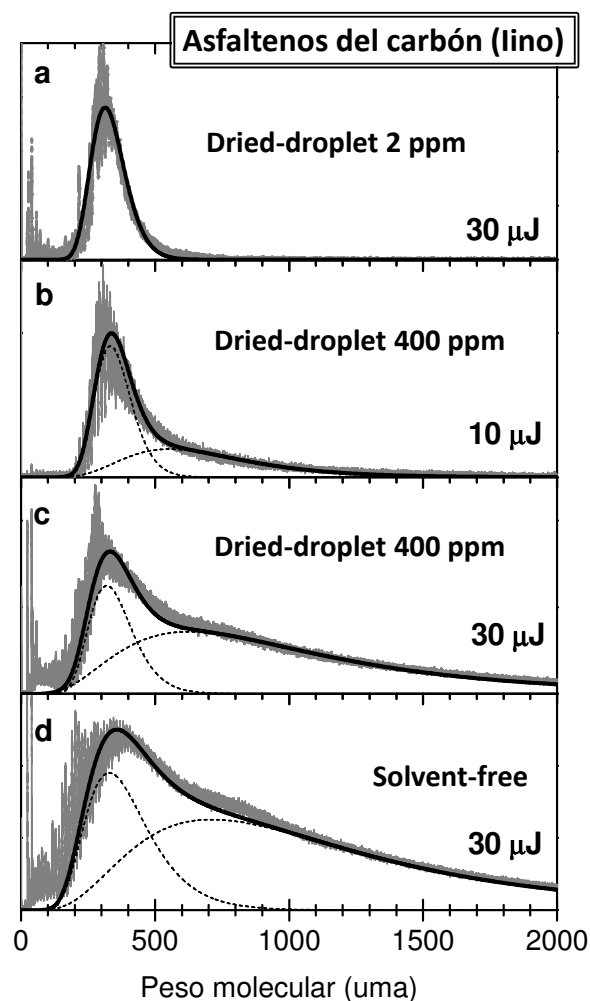


Figura 4.14: Espectros LDI del asfaltano lino, procedente del carbón, obtenidos a partir de muestras preparadas con el método *dried-droplet* a partir de disoluciones en tolueno de distinta concentración: 2ppm (baja concentración, panel a) y 400 ppm (muy concentrada, paneles b y c); y mediante el método *solvent-free* que proporciona una alta densidad del analito en la superficie del portamuestras. En cada panel se indica la energía por pulso láser de 266 nm empleada en los experimentos y las curvas en color negro corresponden al ajuste de distribuciones independientes para los monómeros y los agregados en cada caso.

de las 1000 uma. El aumento de la potencia láser en muestras de igual concentración también produce un aumento de la contribución de elementos más pesados en el espectro de masas (ver paneles b y c). Los resultados son por tanto consistentes con los expuestos anteriormente.



#### 4.4. Conclusiones

En este capítulo se ha empleado la técnica LDI/MALDI-MS para estudiar los procesos de agregación supramolecular de una serie de PAHs y utilizarlos posteriormente como modelo al analizar dos asfaltenos procedentes de petróleos de distinto origen, y otro procedente del carbón, con el objetivo de caracterizar sus distribuciones de masas.

Puesto que los asfaltenos son compuestos que manifiestan una fuerte tendencia a formar agregados, se ha dedicado buena parte del capítulo a evaluar la fiabilidad de la técnica LDI-MS para la determinación de distribuciones de masas de especies polidispersas y de sus agregados no covalentes. Los asfaltenos constituyen una clase compleja de compuestos derivados del carbono, con un apreciable grado de polidispersidad.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio podemos concluir que el peso molecular promedio de los asfaltenos procedentes del petróleo es significativamente inferior a 1000 uma mientras que el de los asfaltenos procedentes del carbón es inferior a 500 uma, siendo por tanto estos últimos mucho más ligeros que los primeros, para los cuales el intervalo promedio de pesos moleculares oscila entre 600 y 800 uma. Los asfaltenos procedentes del petróleo presentan distribuciones de masas con colas que se extienden hacia masas altas, y que caen rápidamente en torno a 1500 uma. Estos resultados están en consonancia con los procedentes de otros estudios de espectrometría de masas, tales como la desorción en plasma [5,32,34,74,77] y con los obtenidos a partir de técnicas de difusión molecular aplicadas a muestras en disolución [62,63].

Se puede concluir también que tanto los PAHs como los asfaltenos agregan eficientemente en el proceso de desorción láser, favoreciéndose dicho efecto al aumentar la densidad de la muestra y la potencia láser y al operar en condiciones de extracción continua de iones. Este último efecto puede interpretarse como una consecuencia de la mejora de las colisiones, inducidas por la aceleración de los iones formados durante los estadios iniciales del proceso de desorción a través del entorno densamente poblado de la pluma de desorción. De-

bemos recalcar que la dinámica de la pluma está conducida por procesos muy complejos y que por tanto las aseveraciones simples deberán ser consideradas con precaución e interpretarse como tentativas para tratar de dilucidar el mecanismo del proceso dominante del problema físico que tratamos de explicar.

Habiendo dicho esto, nuestras observaciones sugieren que las interacciones moleculares en la pluma de desorción dominan el mecanismo de agregación. Mecanismos alternativos, como la desorción directa de agregados desde la muestra sólida pueden no ser despreciables, pero a la luz de nuestros experimentos, la desorción de agregados no puede ser postulada como un proceso que compita al mismo nivel que la agregación en la pluma.

De forma práctica se concluye que la distribución de masas obtenida en experimentos LDI-MS de mezclas complejas y polidispersas de compuestos con alta tendencia a agregar entre sí, tales como los asfaltenos que se han investigado, depende de las condiciones experimentales empleadas. Este efecto es probablemente el responsable de las diferencias observadas en las distribuciones de masas de asfaltenos publicadas por diferentes grupos a partir de experimentos LDI independientes. La supresión de los procesos de agregación, requerida para la determinación fiable de la distribución de masas de las especies estudiadas, demanda una reducción de las colisiones en la pluma de desorción. Esto puede alcanzarse con métodos de preparación de muestras apropiados que proporcionen una dilución eficiente del analito, así como con energías lo suficientemente bajas de los pulsos láser en el proceso de desorción. Un método particularmente eficiente para la preparación de muestras homogéneas de asfalto de baja densidad es la formación controlada de películas ultrafinas en la interfase aire/agua y subsiguiente transferencia al portamuestras. Este método puede aplicarse a un amplio abanico de especies moleculares con propiedades apropiadas para la formación de películas.

Los resultados obtenidos a partir de dichas películas ultrafinas muestran que en películas con una densidad de asfalto lo suficientemente baja, los efectos de agregación en la pluma se hacen insignificantes y los espectros de masas obtenidos son independientes de la energía láser empleada y

del modo de extracción iónico utilizado.

También se han realizado experimentos MALDI de PAHs y asfaltenos sobre muestras preparadas con matrices orgánicas (ditranol, TCNQ) y sales inorgánicas ( $\text{CuSO}_4$ ) mediante el método tradicional de co-precipitación y también en ausencia de disolvente. A partir de los espectros MALDI obtenidos se ha podido determinar con éxito la distribución de masas del monómero de asfaltano, llevando los procesos de agregación en la pluma a un nivel despreciable.

De forma global, el presente estudio muestra que el método de preparación de muestras libre de disolvente es robusto y válido para investigar asfaltenos, especialmente en situaciones donde los efectos de incompatibilidad del disolvente suponen un gran inconveniente.

También se detectaron agregados estables de asfaltenos a partir de análisis LDI de muestras densas. En este caso se obtuvieron distribuciones bimodales con pesos moleculares promedio para ambas bandas de 2200-3100 y 15000-19000 uma, respectivamente. Estos resultados sugieren que el proceso de agregación de los asfaltenos, desde el monómero hasta *clusters* de un número de unidades cada vez mayor, tiene lugar de forma jerárquica, paso a paso, mediante la estabilización de agregados de tamaño creciente, que provocan la formación de disposiciones nanométricas, que forman los cimientos para las estructuras más pesadas.

Los experimentos LDI/MALDI-TOF realizados en hidrocarburos poliaromáticos modelo muestran que las interacciones de tipo  $\pi$  son capaces de promover eficientemente por sí mismas la agregación en la pluma. En ausencia de grupos polares y cadenas laterales en la estructura molecular, la tendencia a formar agregados correlaciona bien con el tamaño del sistema policondensado y con su grado de pericondensación, en acuerdo cualitativo con predicciones teóricas previas. En cambio, la presencia de cadenas alifáticas laterales —efectos estéricos— y de heteroátomos y grupos polares como sustituyentes del carbono en el sistema de anillos dificulta la formación de agregados.

Considerando de forma global los resultados obtenidos en esta investigación y teniendo en cuen-

ta que (1) al aumentar el número de anillos fusionados en un hidrocarburo poliaromático se incrementa su tendencia a formar agregados, que (2) las cadenas alifáticas que aparecen en la estructura molecular inhiben la agregación en la pluma y que (3) ambos tipos de asfaltenos —del petróleo y el carbón— exhiben una tendencia significativa a formar agregados, podemos concluir que deben poseer en su estructura un núcleo aromático policondensado de gran tamaño, con un sistema de entre cuatro y diez anillos fusionados, aunque alguna fracción pueda poseer sistemas aromáticos de distinto tamaño.

También puede considerarse la presencia de una pequeña fracción de compuestos de naturaleza no aromática. Las moléculas de asfaltano con centros poliaromáticos más grandes experimentarán una agregación más eficiente. En este sentido, la realización de estudios detallados de la propensión a formar agregados de subfracciones de asfaltano, obtenidas mediante la extracción con disolventes o por separación cromatográfica, podría proporcionar información muy válida. En la referencia [1] pueden encontrarse estudios muy interesantes relacionados con la caracterización de agregados de asfaltano de tamaño nanométrico mediante diferentes técnicas analíticas.

Puesto que los asfaltenos procedentes del petróleo experimentan una mayor tendencia a formar agregados que los extraídos del carbón, al mismo tiempo que poseen una mayor cantidad de alcanos en su estructura que potencia los efectos estéricos, también puede concluirse que los hidrocarburos poliaromáticos que los constituyen serán de mayor tamaño que los que poseen los asfaltenos procedentes del carbón. Esta afirmación se apoya también en la mayor intensidad relativa que presenta el espectro de absorbancia de los asfaltenos procedentes del carbón a longitudes de onda inferiores a 400 nm, lo que indica que los sistemas aromáticos responsables de la absorbancia en esta zona son de menor tamaño que en el caso de los asfaltenos procedentes del petróleo. La conjunción de PAHs grandes con los pesos moleculares promedio relativamente bajos que presentan los asfaltenos apoya el modelo “isla”, siendo inconsistentes los resultados obtenidos en este trabajo con los sistemas de anillos de pequeño tamaño unidos por enlaces cruzados que postula el modelo “archipiélago”.

Por último debemos mencionar que las observaciones sistemáticas descritas a lo largo del capítulo apoyan el potencial de la técnica LDI/MALDI-MS para la caracterización de compuestos de naturaleza covalente y no covalente en sistemas complejos derivados del carbono. La sensibilidad de la técnica a la formación de agregados en la pluma de de-

sorción, lejos de representar un problema, proporciona una oportunidad única para investigar las interacciones moleculares y los procesos de reconocimiento molecular que tienen lugar bajo condiciones controladas, de forma complementaria a otros métodos experimentales que operan en fase gaseosa y fases condensadas.



---

## Bibliografia

---

- [1] O.C. Mullins, E.Y. Sheu, A. Hammami, A.G. Marshall. *Asphaltenes, Heavy Oils, and Petroleomics* (1st edn). Springer: New York, 2006; ISBN-13: 978-0387317342.
- [2] J.G. Speight. *The Chemistry and Technology of Petroleum* (4th edn). CRC Press: New York, 2006; ISBN-13: 978-0849390678.
- [3] Hsu CS (ed). *Analytical Advances for Hydrocarbon Research (Modern Analytical Chemistry)*. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2003; ISBN-13: 978-0306474767.
- [4] M.M. Haley, R.R. Tykwinski (eds). *Carbon-Rich Compounds: From Molecules to Materials*. John Wiley & Sons: Darmstadt, 2006; ISBN-13: 978-3527312245.
- [5] E.Y. Sheu. *Petroleum asphaltene-properties, characterization, and issues*. Energy & Fuels 16 (1): 74-82 (2002)
- [6] S.B. Howerton, V.L. McGuffin. *Thermodynamic and kinetic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in reversed-phase liquid chromatography*. Analytical Chemistry 75 (14): 3539-3548 (2003)
- [7] C. Mihesan, M. Ziskind, E. Therssen, P. Desgroux, C. Focsa. *IR laser resonant desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Chemical Physics Letters 423 (4-6): 407-412 (2006)
- [8] E.P. Maziarz, G.A. Baker, T.D. Wood. *Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons using silver (I)-mediated ionization*. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie 83 (11): 1871-1877 (2005)
- [9] Hsu CS (ed). *Analytical Advances for Hydrocarbon Research (Modern Analytical Chemistry)*(1st edn) Springer, 2003; ISBN-13: 978-0306474767.
- [10] C. Sluszny, V.V. Gridin, V. Bulatov, I. Schechter. *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in heterogeneous samples*. Reviews in Analytical Chemistry 31 (2): 77-165 (2002)
- [11] Y. Liu, Y. Hashi, J.M. Lin. *Continuous-flow microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in water*. Analytica Chimica Acta 585 (2): 294-299 (2007)
- [12] Q.L. Li, X.Q. Xu, L.F. Sen-Chun, X.R. Wang. *Determination of trace PAHs in seawater and sediment pore-water by solid-phase microextraction (SPME) coupled with GC/MS*. Science in China Series B-Chemistry 49 (6): 481-491 (2006)
- [13] D. Meyer, H. Dressier, W. Ruck. *Improvement of GC sensitivity for polar and nonpolar PAHs by using a deactivated liner*. LC GC North America 25 (2): 180 (2007)

- [14] N.E. Díaz-Morales, H.J. Garza-Ulloa, R. Castro-Ríos, E.G. Ramírez-Villarreal, J.M. Barbarín-Castillo, M.D.L. Salazar-Cavazos, N. Waksman-de Torres. *A comparison of the performance of two chromatographic and three extraction techniques for the analysis of PAHs in sources of drinking water*. Journal of Chromatographic Science 45 (2): 57-62 (2007)
- [15] M.D. Lobato, J.M. Pedrosa, A.R. Hortal, B. Martínez-Haya, S. Lago. *Characterization and Langmuir film properties of asphaltenes extracted from Arabian light crude oil*. Colloids and Surfaces A 298 (1-2): 72-79 (2007)
- [16] O. Sedo, M. Alberti, J. Janca, J. Havel. *Laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry of various carbon materials*. Carbon 44 (5): 840-847 (2006)
- [17] K. Yoshimura, L. Przybilla, S. Ito, J.D. Brand, M. Wehmeir, H.J. Räder, K. Müllen. *Characterization of large synthetic polycyclic aromatic hydrocarbons by MALDI- and LD-TOF mass spectrometry*. Macromolecular Chemistry and Physics 202 (2): 215-222 (2001)
- [18] B. Apicella, M. Millan, A.A. Herod, A. Carpentieri, P. Pucci, A. Ciajolo. *Separation and measurement of flame-formed high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by sizeexclusion chromatography and laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (7): 1104-1108 (2006)
- [19] W.F. Edwards, M.C. Thies. *Dense-Gas Fractionation and MALDI Characterization of Carbonaceous Pitches*. Energy & Fuels 19 (3): 984-991 (2005)
- [20] A.R. Hortal, B. Martínez-Haya, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa, S. Lago. *On the determination of molecular weight distributions of asphaltenes and their aggregates in laser desorption ionization experiments*. Journal of Mass Spectrometry 41 (7): 960-968 (2006)
- [21] A.G. Marshall, R.P. Rodgers. *Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis*. Accounts of Chemical Research 37 (1): 53-59 (2004)
- [22] J.F. Hamilton, A.C. Lewis, M. Millan, K.D. Bartle, A.A. Herod, R. Kandiyoti. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry of coal liquids produced during a coal liquefaction process*. Energy & Fuels 21 (1): 286-294 (2006)
- [23] M. Millan, M. Behrouzi, F. Karaca, T.J. Morgan, A.A. Herod, R. Kandiyoti. *Characterising high mass materials in heavy oil fractions by size exclusion chromatography and MALDI-mass spectrometry*. Catalysis Today 109 (1-4): 154-161 (2005)
- [24] M. Millan, T.J. Morgan, M. Behrouzi, F. Karaca, C. Galmes, A.A. Herod, R. Kandiyoti. *The high-mass component ( $>m/z$  10,000) of coal tar pitch by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry and size-exclusion chromatography*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19 (13): 1867-1873 (2005)
- [25] S. Trimpin, S. Keune, H.J. Räder, K. Müllen. *Solvent-free MALDI-MS:developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules*. Journal of American Society for Mass Spectrometry 17 (5): 661-671 (2006)
- [26] W.F. Edwards, L. Jin, M.C. Thies. *MALDI-TOF mass spectrometry: obtaining reliable mass spectra for insoluble carbonaceous pitches*. Carbon 41 (14): 2761-2768 (2003)
- [27] J.K. Pruns, J.P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, U. Hintze, W.A. König. *Characterization of low molecular weight hydrocarbon oligomers by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a solvent-free sample preparation method*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 16 (3): 208-211 (2002)

- [28] L. Pryzbilla, J. D. Brand, K. Yoshimura, H.J. Räder, K. Mullen. *MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation*. Analytical Chemistry 72 (19): 4591-4597 (2000)
- [29] M.P. Chiarelli, H.F. Chang, K.W. Olsen, D. Barbacci, B.P. Cho. *Structural differentiation of diastereomeric benzo(g,h,i)fluoranthene adducts of desoxyadenosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and postsorce decay*. Chemical Research in Toxicology 16 (10): 1236-1241 (2003)
- [30] M. Bente, T. Adam, T. Ferge, S. Gallavardin, M. Sklorz, T. Streibel, R. Zimmermann *An on-line aerosol laser mass spectrometer with three, easily interchangeable laser based ionisation methods for characterisation of inorganic and aromatic compounds on particles*. International Journal of Mass Spectrometry 258 (1-3): 86-94 (2006)
- [31] T. Adam, T. Streibel, S. Mitschke, F. Muhlberger, R.R. Baker, R. Zimmermann. *Application of time-of-flight mass spectrometry with laser-based photoionization methods for analytical pyrolysis of PVC and tobacco*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 74 (1-2): 454-464 (2005)
- [32] K. Qian, K.E. Edwards, M. Siskin, W.N. Olmstead, A.S. Mennito, G.J. Dechert, N.E. Hoosain. *Desorption and ionization of heavy petroleum molecules and measurement of molecular weight distributions*. Energy & Fuels 21 (2): 1042-1047 (2007)
- [33] O.C Mullins. *The Modified Yen Model*. Energy & Fuels 24 (4): 2179-2207 (2010)
- [34] G.C. Klein, S. Kim, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, A. Yen, S. Asomaning. *Mass spectral analysis of asphaltenes. I. Compositional differences between pressure-drop and solvent-drop asphaltenes determined by electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Energy & Fuels 20 (5): 1965-1972 (2006)
- [35] G.C. Klein, S. Kim, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, A. Yen. *Mass spectral analysis of asphaltenes. II. Detailed compositional comparison of asphaltenes deposit to its crude oil counterpart for two geographically different crude oils by ESI FT-ICR MS*. Energy & Fuels 20 (5): 1973-1979 (2006)
- [36] R.P. Rodgers, A.G. Marshall. *Chapter 3: Petroleomics: Advanced Characterization of Petroleum Derived Materials by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR MS). Asphaltenes, heavy oils and petroleomics* Springer: New York 2006, pp 63–93; ISBN-13: 978-0387317342.
- [37] A.G. Marshall, R.P. Rodgers. *Petroleomics: Chemistry of the underworld PNAS* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 2008, vol. 105, 47:18090-18095.
- [38] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall. *Heavy Petroleum Composition. 1. Exhaustive Compositional Analysis of Athabasca Bitumen HVGO Distillates by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Definitive Test of the Boduszynski Model*. Energy & Fuels 24 (5): 2929-2938 (2010)
- [39] Y.E. Corilo, B.G. Vaz, R.C. Simas, H.D. Lopes Nascimento, C.F. Klitzke, R.C.L. Pereira, W.L. Bastos, E.V. Santos Neto, R.P. Rodgers, M.N. Eberlin. *Petroleomics by EASI(±) FT-ICR MS*. Analytical Chemistry 82 (10): 3990-3996 (2010)
- [40] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall. *Identification of Vanadyl Porphyrins in a Heavy Crude Oil and Raw Asphaltene by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry*. Energy & Fuels 23 (4): 2122-2128 (2009)

- [41] F.A. Fernandez-Lima, C. Becker, A.M. McKenna, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, D.H. Russell. *Petroleum crude oil characterization by IMS-MS and FTICR MS*. Analytical Chemistry 81 (24): 9941-9947 (2009)
- [42] S. Quan, H. Dujie, H.C. Keng, X. Chunming, Z. Suoqi, Y. Zhang. *Characterization of Heteroatom Compounds in a Crude Oil and Its Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes (SARA) and Non-basic Nitrogen Fractions Analyzed by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Energy & Fuels 24 (4): 2545-2553 (2010)
- [43] M. Hur, I. Yeo, E. Park, Y.H. Kim, J. Yoo, E. Kim, M.H. No, J. Koh, S. Kim. *Combination of statistical methods and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for more comprehensive, molecular-level interpretations of petroleum samples*. Analytical Chemistry 82 (1): 211-218 (2010)
- [44] D.S. Pinkston, P. Duan, V.A. Gallardo, S.C. Habicht, X.L. Tan, K.N. Qian, M. Gray, K. Mullen, H.I. Kenttämä. *Analysis of Asphaltenes and Asphaltene Model Compounds by Laser-Induced Acoustic Desorption/Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Energy & Fuels 23(11): 5564-5570 (2009)
- [45] O.C. Mullins, B. Martínez-Haya, A.G. Marshall. *Contrasting Perspective on Asphaltene Molecular Weight. This Comment vs the Overview of A. A. Herod, K. D. Bartle, and R. Kandiyoti*. Energy & Fuels 22 (3): 1765-1773 (2008)
- [46] R.I. Cunico, E.Y. Sheu, O.C. Mullins. *Molecular Weight Measurement of UG8 Asphaltene Using APCI Mass Spectroscopy*. Petroleum Science and Technology 22 (7-8): 787-798 (2004)
- [47] B. Apicella, M. Alfe, A. Ciajolo. *Mass Spectrometric Advances in the Analysis of Large Aromatic Fractions of Heavy Fuel Oils and Carbon Particulates*. Combustion Science and Technology 182 (4-6): 640-652 (2010)
- [48] M.M. Boduszynski. *Chapter 7: In Chemistry of Asphaltenes* J.W. Bunger, N.C. Li. Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1982; Vol. 195; . pp 119-135.
- [49] B. Martínez-Haya, A.R. Hortal, P.M. Hurtado, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa. *Laser desorption/ionization determination of molecular weight distributions of polyaromatic carbonaceous compounds and their aggregates*. Journal of Mass Spectrometry 42 (6): 701-713 2007
- [50] A.R. Hortal, P.M. Hurtado, B. Martínez-Haya, O.C. Mullins. *Molecular-Weight Distributions of Coal and Petroleum Asphaltenes from Laser Desorption/Ionization Experiments*. Energy & Fuels 21 (5): 2863-2868 (2007)
- [51] P.M. Hurtado, A.R. Hortal, B. Martínez-Haya. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (18): 3161-3164 (2007)
- [52] A.E. Pomerantz, M.R. Hammond, A.L. Morrow et al. *Two-Step Laser Mass Spectrometry of Asphaltenes*. Journal of The American Chemical Society 130 (23): 7216-7217 (2008)
- [53] A.E. Pomerantz, M.R. Hammond, A.L. Morrow, O.C. Mullins, R.N. Zare. *Asphaltene Molecular-Mass Distribution Determined by Two-Step Laser Mass Spectrometry*. Energy & Fuels 23 (3): 1162-1165 (2009)
- [54] H. Sabbah, A.L. Morrow, A.E. Pomerantz, O.C. Mullins, X. Tan, M.R. Gray, K. Azyat, R.R. Tykwinski, R.N. Zare. *Comparing Laser Desorption/Laser Ionization Mass Spectra of Asphaltenes and Model Compounds*. Energy & Fuels 24 (6): 3589-3594 (2010)



- [55] A. Rizzi, P. Cosmina, C. Flego, L. Montanari, R. Seraglia, P. Raldi. *Laser desorption/ionization techniques in the characterization of highmolecularweight oil fractions. Part 1: asphaltenes*. Journal of Mass Spectrometry 41 (9): 1232-1241 (2006)
- [56] R. Tanaka, S. Sato, T. Takanohashi, J.E. Hunt, R.E. Winans. *Analysis of the molecular weight distribution of petroleum asphaltenes using laser desorption-mass spectrometry*. Energy & Fuels 18 (5): 1405-1413 (2004)
- [57] K. S. Kim, P. Tarakeshwar, J. Y. Lee. *Molecular clusters of  $\delta$ -systems: theoretical studies of structures, spectra, and origin of interaction energies*. Chemical Reviews 100 (11): 4145-4185 (2000)
- [58] O.A. Lilienfeld, D. Andrienko. *Coarse-grained interaction potentials for polyaromatic hydrocarbons*. Journal of Chemical Physics 124 (5): Art. No. 054307 (2006)
- [59] D.W. Breiby et al. *In situ studies of phase transitions in thin discotic films*. Journal of Physical Chemistry B. 109 (47): 22319-22325 (2005)
- [60] J.G. Speight. *Petroleum Asphaltenes, Part 1. Asphaltenes, resins and the structure of petroleum*. Oil and Gas Science and Technology. Revue De L'Institut Français Du Pétrole 59 (5): 467-477 (2004)
- [61] E. Buenrostro-Gonzalez, H. Groenzin, C. Lira-Galeana, O.C. Mullins. *The overriding chemical principles that define asphaltenes*. Energy & Fuels 15 (4): 972-978 (2001)
- [62] S. Badre, C.C. Goncalves, K. Norinaga, G. Gustavson, O.C. Mullins. *Molecular size and weight of asphaltene and asphaltene solubility fractions from coals, crude oils and bitumen*. Fuel 85 (1): 1-11 (2006)
- [63] A.B. Andrews, R.E. Guerra, O.C. Mullins, P.N. Sen. *Diffusivity of asphaltene molecules by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A 110 (26): 8093-8097 (2006)
- [64] F.A. Ali, N. Ghaloum, A. Hauser. *Structure representation of asphaltene GPC fractions derived from Kuwaiti residual oils*. Energy & Fuels 20 (1): 231-238 (2006)
- [65] S.G. Roussis, R. Proulx. *Probing the molecularweight distribution of non-boiling petroleum fractions by AgC electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18 (15): 1761-1775 (2004)
- [66] S. Acevedo, L.B. Gutierrez, G. Negrín, J.C. Pereira, B. Mendez, F. Delolme, G. Dessalces, D. Broseta. *Molecular weight of petroleum asphaltenes: a comparison between mass spectrometry and vapor pressure osmometry*. Energy & Fuels 19 (4): 1548-1560 (2005)
- [67] I. Suelves, C.A. Islasa, M. Millan, C. Galmes, J.F. Carter, A.A. Herod, R. Kandiyoti. *Chromatographic separations enabling the structural characterisation of heavy petroleum residues*. Fuel 82 (1): 1-14 (2003)
- [68] S. Sato, T. Takanohashi. *Molecular weight calibration of asphaltenes using gel permeation chromatography/mass spectrometry*. Energy & Fuels 19 (5): 1991-1994 (2005)
- [69] C. Robins, P.A. Limbach. *The use of nonpolar matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of high boiling crude oil fractions*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 17 (24): 2839-2845 (2003)
- [70] L. Artok, Y. Su, Y. Hirose, M. Hosokawa, S. Murata, M. Nomura. *Structure and reactivity of petroleum-derived asphaltene*. Energy & Fuels 13 (2): 287-296 (1999)
- [71] J.T. Miller, R.B. Fisher, P. Thiyagarajan, R.E. Winans, J.E. Hunt. *Subfractionation and characterization of mayan asphaltene*. Energy & Fuels 12 (6): 1290-1298 (1998)

- [72] J. Ancheyta, G. Centeno, F. Trejo, G. Marroquín, J.A. García, E. Tenorio, A. Torres. *Extraction and characterization of asphaltenes from different crude oils and solvents*. Energy & Fuels 16 (5): 1121-1127 (2001)
- [73] D. Vazquez, G.A. Mansoori. *Identification and measurement of petroleum precipitates*. Journal of Petroleum Science and Engineering 26 (1-4): 49-55 (2000)
- [74] O.P. Strausz, P. Peng, J. Murgich. *About the colloidal nature of asphaltenes and the MW of covalent monomeric units*. Energy & Fuels 16 (4): 809-822 (2002)
- [75] M.N. Siddiqui, M.F. Ali, J. Shirokoff. *Use of x-ray diffraction in assesing the aging pattern of asphalt fractions*. Fuel 81 (1): 51-58 (2002)
- [76] H. Groenzin, O.C. Mullins. *Asphaltene molecular size and structure*. Journal of Physical Chemistry A 103 (51): 11237-11241 (1999)
- [77] M. Domin, A.A. Herod, R. Kandiyoti, J.W. Larsen, M.J. Lazaro, S. Li, P. Rahimi. *A comparative study of bitumen molecular weight distributions*. Energy & Fuels 13 (3): 552-557 (1999)
- [78] G.W. Zajac, N.K. Sethi, J.T. Joseph, D. Sellis, C. Pareiss. *Maya Petroleum Asphaltene Imaging by Scanning Tunneling Microscopy: verification of structure from  $^{13}\text{C}$  and proton nuclear magnetic resonance*. American Chemical Society. Division of Fuel Chemistry 42: 423-426 (1997)
- [79] J.P. Dickie, T.F. Yen. *Macrostructures of the asphaltic fractions by various instrumental methods*. Analytical Chemistry 39 (14): 1847-1852 (1967)
- [80] M. Domin, R. Moreea, M.J. Lazaro, A.A. Herod, R. Kandiyoti. *Choice of extraction voltage and matrix in the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of coal tar pitch – pyridine insolubles*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 11 (6): 638-645 (1997)
- [81] J.H. Pacheco-Sánchez, I.P. Zaragoza, J.M. Martínez-Magadán. *Asphaltene aggregation under vacuum at different temperatures by molecular dynamics*. Energy & Fuels 17 (5): 1346-1355 (2003)
- [82] R. Tanaka, J.E. Hunt, R.E. Winans, P. Thiyagarajan, S. Sato, T. Takanohashi. *Aggregates structure analysis of petroleum asphaltenes with small-angle neutron scattering*. Energy & Fuels 17 (1): 127-134 (2003)
- [83] K.L. Gawrys, P.K. Kilpatrick. *Asphaltenic aggregates are polydisperse oblate cylinders*. Journal of Colloid and Interface Science 288 (2): 325-334 (2005)
- [84] Freed, D. E.; Lisitza, N. V.; Sen, P. N.; Song, Y. Q. Asphaltenes, HeaVy Oils, and Petroleomics; Mullins, O. C., Sheu, E. Y., Hammami, A., Marshall, A. G., Eds.; Springer: New York, 2007; Chapter 11.
- [85] G. Andreatta, N. Bostrom, O.C. Mullins. *High-Q Ultrasonic Determination of the Critical Nanoaggregate Concentration of Asphaltenes and the Critical Micelle Concentration of Standard Surfactants*. Langmuir 21 (7): 2728-2736 (2005)
- [86] E.Y. Sheu, Y. Long, H. Hamza. *Chapter 10. Asphaltenes, HeaVy Oils, and Petroleomics*. O.C. Mullins, E.Y. Sheu, A. Hammami, A.G. Marshall, Eds. Springer: New York, 2007.
- [87] L. Buch, H. Groenzin, E. Buenrostro-Gonzalez, S.I. Andersen, C. Lira-Galeana, O.C. Mullins. *Molecular size of asphaltene fractions obtained from residuum hydrotreatment*. Fuel 82 (9): 1075-1084 (2003)
- [88] Y. Ruiz-Morales, O.C. Mullins. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Asphaltenes Analyzed by Molecular Orbital Calculations with Optical Spectroscopy*. Energy & Fuels 21 (1): 256-265 (2007)

- 
- [89] Ruiz-Morales, Y.; Wu, X.; Mullins, O.C. *Electronic Absorption Edge of Crude Oils and Asphaltenes Analyzed by Molecular Orbital Calculations with Optical Spectroscopy*. *Energy & Fuels* 21 (2): 944-952 (2007)
- [90] H. Groenzin, O.C. Mullins. *Molecular Size and Structure of Asphaltenes from Various Sources*. *Energy & Fuels* 14 (3): 677-684 (2000)
- [91] A. Sharma, H. Groenzin, A. Tomita, O.C. Mullin. *Probing order in asphaltenes and aromatic ring systems by HRTEM*. *Energy & Fuels* 16 82): 490-496 (2002)
- [92] Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Asphaltenes, Heavy Oils, and Petroleomics*; Mullins, O. C., Sheu, E. Y., Hammami, A., Marshall, A. G., Eds.; Springer: New York, 2007; Chapter 3.
- [93] J.M. Sheremata, M.R. Gray, H.D. Dettman, W.C. McCaffrey. *Quantitative Molecular Representation and Sequential Optimization of Athabasca Asphaltenes*. *Energy & Fuels* 18 (5): 1377-1384 (2004)
- [94] Y. Ruiz-Morales, O.C. Mullins. *Measured and Simulated Electronic Absorption and Emission Spectra of Asphaltenes*. *Energy & Fuels* 23 (3): 1169-1177 (2009)
- [95] F. Alvarez-Ramirez, E. Ramirez-Jaramillo, Y. Ruiz-Morales. *Calculation of the interaction potential curve between asphaltene-asphaltene, asphaltene-resin, and resin-resin systems using density functional theory*. *Energy & Fuels* 20 (1): 195-204 (2006)



## CAPÍTULO 5

---

### Caracterización de asfaltenos mediante experimentos de desorción/posicionización láser (L2MS)

---

En este capítulo se pretende profundizar en la determinación de las distribuciones de masas de los asfaltenos, aportando los resultados obtenidos al emplear las técnicas de desorción/ionización láser (LDI) y de desorción/posicionización láser (L2MS) utilizando radiación láser ultravioleta e infrarroja. En los experimentos LDI se ha utilizado un único láser ultravioleta (280 nm) o infrarrojo (3.45  $\mu\text{m}$ ) para producir la desorción e ionización de los asfaltenos. En el caso de los experimentos L2MS, los asfaltenos neutros desorbidos con radiación láser ultravioleta o infrarroja se ionizan en fase gaseosa mediante radiación láser ultravioleta (266 nm) de alta potencia. El estudio confirma que los experimentos UV-LDI dan lugar a la formación de agregados de asfaleno en la pluma de forma eficiente, mientras que por el contrario, tanto en experimentos IR-LDI como en los UV/UV-L2MS y IR/UV-L2MS, la agregación se suprime significativamente y los espectros obtenidos reproducen con mayor precisión la distribución de pesos moleculares propia de las moléculas de asfaleno, centrada alrededor de las 500-600 m/z. Mostraremos también que los experimentos realizados con dos láseres proporcionan información útil acerca de la dinámica del proceso de desorción láser.



## 5.1. Introducción

Hemos discutido extensamente que en experimentos LDI típicos de asfaltenos con pulsos láser ultravioleta, las especies ionizadas y neutras agregan eficientemente en la pluma de desorción, dando lugar a distribuciones de pesos moleculares desplazadas hacia masas mayores, lo que ha originado una gran controversia en el campo en los últimos años [1]. De hecho, las bajas concentraciones críticas de floculación y formación de nanoagregados que presentan los asfaltenos, son las responsables de sus propiedades prácticas más relevantes, ya que afectan a su viscosidad, transferencia calorífica, lubricación y eficiencia de la combustión del petróleo [2–4]. Para reducir tales efectos de agregación, la densidad de material de la pluma debe mantenerse lo suficientemente baja durante el experimento, mediante la dilución del analito de interés y la atenuación de la energía del pulso láser [5, 6], como se expuso en el capítulo anterior.

Estudios previos recientes han demostrado la viabilidad de las técnicas de desorción/postionización láser acopladas con espectrometría de masas (L2MS) para la caracterización de hidrocarburos poliaromáticos [7–12] y más recientemente de asfaltenos [13–15] sin interferencia de efectos de agregación. El grupo de R. Zare (Stanford, USA) indujo la desorción de asfaltenos neutros mediante un láser de CO<sub>2</sub> (que emite radiación en el infrarrojo lejano, a 10,6  $\mu\text{m}$ ), para posteriormente ionizarlos en estado gaseoso mediante un pulso láser ultravioleta aplicado con un cierto retraso. La distribución de masas obtenida presenta un máximo en  $\approx 600$  uma, sin signos de agregación [13, 14], y muestra una gran similitud con las distribuciones típicas que se obtienen con FT-ICR acoplada con ionización mediante electronebulización [16–18].

El estudio que nos ocupa amplía estas investigaciones previas mediante el uso de radiación láser en el infrarrojo medio a 3.45  $\mu\text{m}$  y en el ultravioleta a 280 nm para desorber las muestras. Los experimentos se han realizado con muestras de asfalto de un petróleo kuwaití UG8, cuyo peso molecular promedio se sitúa en torno a las 500–600 uma [19]. Este asfalto se ha utilizado como modelo en numerosas investigaciones previas [1, 19] y, en particular, en experimentos L2MS en los que

se desorben las muestras con radiación láser en el infrarrojo lejano [13, 14].

Nuestros experimentos abarcan cuatro tipos de configuraciones experimentales para la desorción/ionización de las muestras, utilizando uno o dos láseres:

- UV-LDI a 280 nm
- IR-LDI a 3.45  $\mu\text{m}$
- UV/UV-L2MS
- IR/UV-L2MS

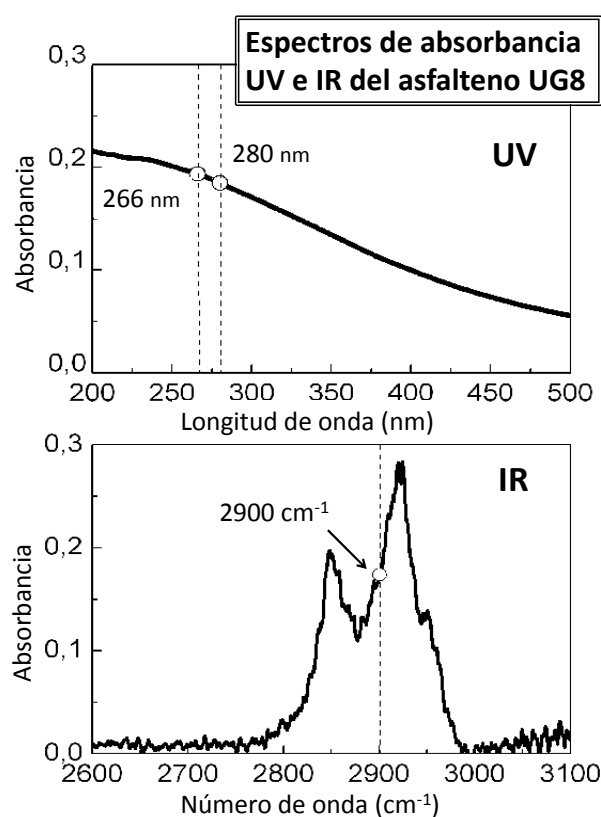


Figura 5.1: Espectros de absorbancia ultravioleta e infrarrojo del asfalto UG8. El espectro UV se obtuvo a partir de una película fina de asfalto depositada en una placa de cuarzo. Para el espectro IR se utilizó una pastilla de asfalto UG8 y KBr. Las líneas discontinuas indican las longitudes de onda empleadas en los experimentos LDI y L2MS: 280 nm y 2900  $\text{cm}^{-1}$  (3.45  $\mu\text{m}$ ) para la desorción y 266 nm para la posionización (ionización de neutros con un segundo láser).

La radiación láser infrarroja empleada para la

desorción del UG8 excita de forma resonante vibraciones de estiramiento del enlace C-H del asfalto, mientras que la radiación ultravioleta utilizada para la desorción (280 nm) y la ionización de neutros en la pluma (266 nm) están asociadas a bandas de absorción electrónica del asfalto de gran intensidad relativa, tal y como ilustra la figura 5.1.

### 5.1.1. Objetivos

Este estudio tiene como objetivo demostrar que la técnica L2MS puede aplicarse al análisis de asfaltos empleando láseres de desorción en el ultravioleta e infrarrojo medio. Esta aproximación permite obtener distribuciones de masas fiables para los asfaltos, similares a las publicadas previamente empleando radiación láser en el infrarrojo lejano procedente del láser de CO<sub>2</sub> en el proceso de desorción.

Desde un punto de vista fundamental, se estudiará la evolución de la señal L2MS en función del retraso temporal aplicado entre los pulsos de desorción e ionización, con el objetivo de obtener información acerca de la dinámica de los procesos de desorción ultravioleta e infrarrojo.

## 5.2. Discusión de resultados

### 5.2.1. Aspectos técnicos y metodológicos

Para la realización de los experimentos L2MS se prepararon pastillas de la mezcla del asfalto UG8 con bromuro de potasio en una proporción 1:5 en peso. Esta pastilla se colocó en la placa repulsora y sobre ella se enfocaron el haz láser infrarrojo (focal de 20 cm) y el haz ultravioleta (focal de 25 cm), a la vez que se rotaba la muestra. En los experimentos LDI los iones son extraídos aplicando retrasos típicos de 1  $\mu$ s con respecto al láser de desorción, mientras que en los de tipo L2MS, el voltaje de extracción se aplica de forma continua para separar cualquier ion generado de forma residual mediante LDI de los neutros ionizados en la pluma. La desorción se induce bien con radiación láser ultravioleta (280 nm, 1-10  $\mu$ J/pulso) o con

radiación infrarroja (3,45  $\mu$ m, 0.5 - 3 mJ/pulso). La ionización de los neutros se consigue mediante la absorción de radiación láser de 266 nm (3 mJ/pulso), enfocada en la pluma a 3 mm de la muestra. El retraso entre el láser de desorción e ionización se fijó de forma sistemática en una serie de valores comprendidos entre 1 y 100  $\mu$ s en distintos experimentos. En el capítulo 2 se muestra una imagen esquemática (ver figura 2.5) del montaje experimental utilizado en los experimentos de tipo L2MS.

En los siguientes apartados se discuten los resultados obtenidos en cada una de las modalidades experimentales consideradas en este estudio.

### 5.2.2. Experimentos UV-LDI

La mayoría de los estudios UV-LDI previos de nuestro grupo realizados con asfaltos se han encaminado a desarrollar estrategias para evitar los efectos de agregación que experimentan los asfaltos en el entorno densamente poblado de la pluma en los estadios tempranos del proceso de desorción láser [1, 5, 6, 19, 20]. En el capítulo 4 se demostró que sólo con la suficiente dilución de los asfaltos, la distribución de masas obtenida en los espectros corresponde a los monómeros y se vuelve independientes en gran medida de la potencia láser con la que se irradia la muestra. Debido a que los experimentos de este estudio se han realizado utilizando una pastilla de asfalto en polvo concentrado, esperamos la aparición de efectos de agregación pronunciados en el proceso LDI.

El panel superior de la figura 5.2 muestra espectros LDI típicos del asfalto UG8 obtenido mediante irradiación con pulsos láser de 280 nm. Estos espectros demuestran que efectivamente las medidas UV-LDI dan lugar invariablemente a una distribución ancha dominada por la formación de agregados, con un máximo alrededor de 1000 m/z y con una larga cola que se extiende hacia varios millares de unidades de masa. Tal distribución se desvía bastante de las publicadas para el monómero del asfalto UG8. Debido a la alta concentración de asfalto en la muestra, se obtuvieron señales similares a todas las potencias láser utilizadas por encima del umbral de ionización.



### 5.2.3. Experimentos IR-LDI

La ablación láser infrarroja y la espectrometría de masas constituyen técnicas consolidadas para el análisis químico de biomoléculas [8, 21, 22] y compuestos poliaromáticos en muestras sólidas [8,9,11]. Sin embargo, no tenemos conocimiento de aplicaciones previas de dicha técnica para la caracterización de mezclas complejas de hidrocarburos como los asfaltenos.

El panel inferior de la figura 5.2 muestra dos espectros LDI del asfalteno UG8 obtenidos mediante su irradiación con pulsos láser de  $3.45\ \mu\text{m}$  de diferente energía. Se requirieron energías por pulso de 1-3 mJ, correspondientes a fluencias (energía láser depositada por unidad de área) de  $10\text{-}30\ \text{J cm}^{-2}$  para obtener distribuciones de masas bien definidas. Se realizaron también experimentos fuera de resonancia (por ejemplo, a  $3.45\ \mu\text{m}$ ) que demandaron energías láser más altas para la detección de iones y no se discutirán aquí.

Es interesante el hecho de que los espectros IR-LDI estén centrados en torno a  $500\text{-}600\ m/z$ , como se espera de la muestra de asfalteno UG8, y que muestren solo una débil señal procedente de los agregados a  $m/z$  alrededor de 1000 a todas las energías láser aplicadas. La supresión de la agregación del asfalteno en experimentos IR-LDI en contraposición a lo que sucede en los de tipo UV-LDI, está relacionada posiblemente con dos efectos principales: (i) una formación menos eficiente de fotofragmentos reactivos en comparación con experimentos UV-LDI y (ii) el recalentamiento y la subsiguiente vaporización explosiva del asfalteno provocada por el pulso infrarrojo –pluma con mayor temperatura– [21, 23, 24], lo cual reduciría la formación de agregados no covalentes. Estos aspectos se discutirán más adelante con mayor detalle.

### 5.2.4. Experimentos UV/UV-L2MS

Este tipo de experimentos se llevó a cabo con pulsos láser de desorción de  $280\ \text{nm}$  y  $1.5\ \mu\text{J}$  de energía (lo que equivale a fluencias de  $\approx 0.015\ \text{J cm}^{-2}$ ), que se encuentran justo por debajo del umbral para la aparición de iones en el espectro de masas. Tras la desorción los neutros se ionizaron

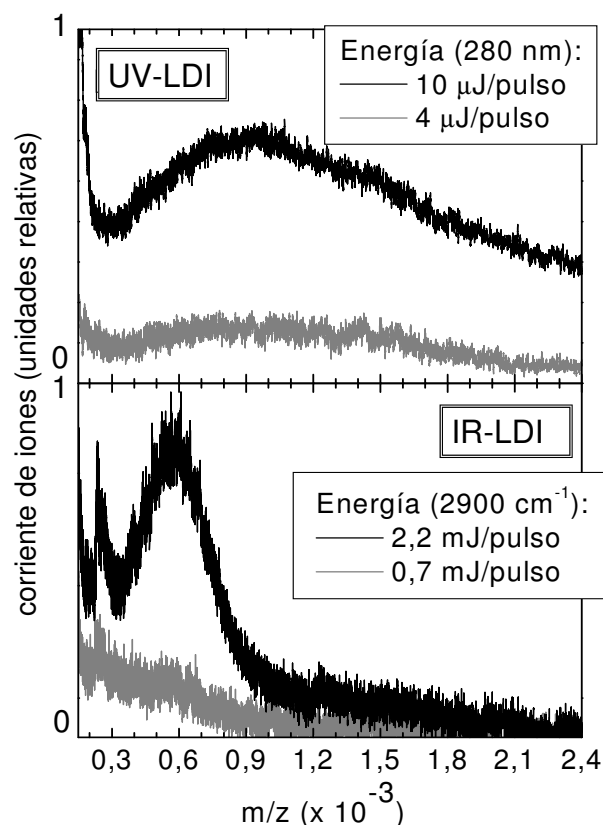


Figura 5.2: **Espectros UV-LDI e IR-LDI del asfalteno UG8.** Los espectros UV-LDI (panel superior) se obtuvieron empleando radiación láser ultravioleta de  $280\ \text{nm}$  y los espectros IR-LDI (panel inferior) se midieron utilizando radiación infrarroja de  $3.45\ \mu\text{m}$ . En cada uno de los paneles se indica la energía por pulso aplicada para la obtención de los espectros. Nótese que los valores de unidades de masa ( $m/z$ ) están divididos por 1000.

mediante pulsos láser de  $266\ \text{nm}$  de  $3\ \text{mJ}$  de energía, retrasados temporalmente con respecto de la desorción. A esta longitud de onda tiene lugar la ionización resonante mediante dos fotones ( $1 + 1$ ) de los componentes poliaromáticos de los asfaltenos [13–15, 25].

La figura 5.3 muestra una serie de espectros representativa de los experimentos de este tipo realizados con el asfalteno UG8. Puede observarse que la resolución de los espectros de masas en el intervalo de interés es suficiente como para mostrar una progresión de picos bien resueltos en el intervalo  $300\text{-}800\ m/z$ , con un espaciado regular de  $24\ \text{u}$ .

dades de masa. En estudios LDI previos de otros grupos se observaron progresiones similares de picos, siendo atribuidas a moléculas de asfalto que incorporan anillos adicionales en sus centros poliaromáticos, lo cual supone la incorporación de grupos  $C_2H_2$  a la molécula.

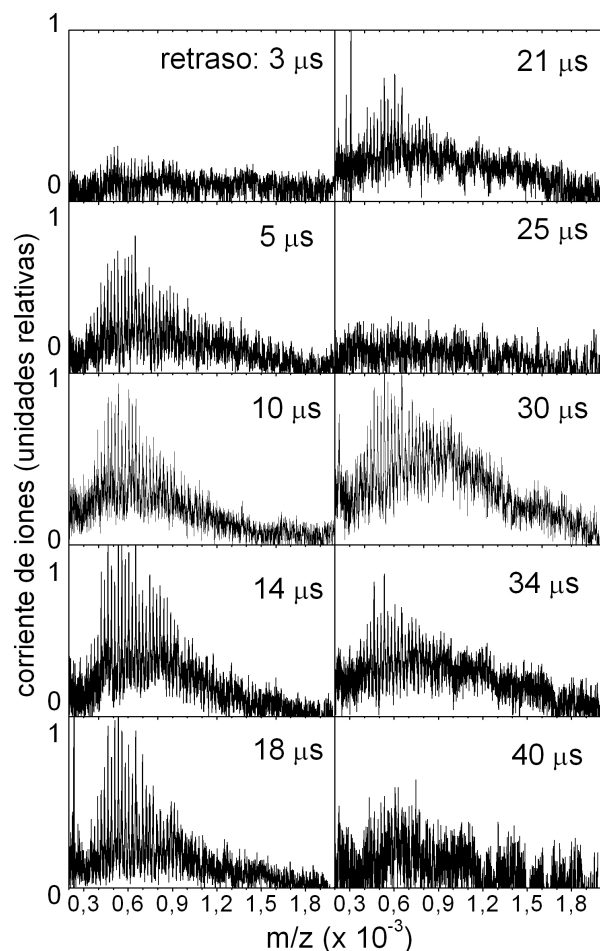


Figura 5.3: Espectros UV/UV-L2MS del asfalto UG8 registrados fijando distintos retrasos temporales entre los pulsos láser de desorción (280 nm, 1.5  $\mu$ J/pulso) y posionización (266 nm, 3mJ/pulso). Los retrasos se indican en cada panel.

Inesperadamente, en las medidas UV/UV se detectaron dos grupos de asfaltenos en ventanas temporales de posionización claramente diferenciadas. Un primer grupo constituido por aductos más rápidos aparece al aplicar retrasos entre el láser de desorción y el de ionización de entre 4 y 22  $\mu$ s, y un segundo grupo de aductos, más lentos, se detecta en la ventana temporal de 28–40  $\mu$ s. A retrasos temporales intermedios (23–27  $\mu$ s) la señal de aductos es mucho más débil. Esta característica puede apreciarse en la figura 5.4, que muestra la señal

integrada de la corriente de iones detectada a diferentes retrasos entre los pulsos láser de desorción e ionización. La presencia de componentes con diferentes velocidades en la pluma de desorción se observó de forma sistemática en series de experimentos independientes, y su posible origen se discutirá más adelante.

Es interesante resaltar que el peso molecular promedio de los aductos iónicos detectados incrementa desde 650–750  $m/z$ , en los espectros LDI registrados en la ventana temporal de 4–22  $\mu$ s de retraso entre ambos láseres, hasta 900–1000  $m/z$ , para aquellos tomados en la ventana temporal de 30–40  $\mu$ s. El grado de agregación es por tanto mayor en los productos de desorción más lentos.

En cualquier caso, la baja fluencia aplicada para la desorción de los asfaltenos en los experimentos UV/UV-L2MS realizados, es la responsable de que en el transcurso del experimento se mantenga un grado de agregación de los mismos mucho más bajo, que el que se produce en los experimentos UV-LDI, en los que un único láser provoca la desorción e ionización de la muestra.

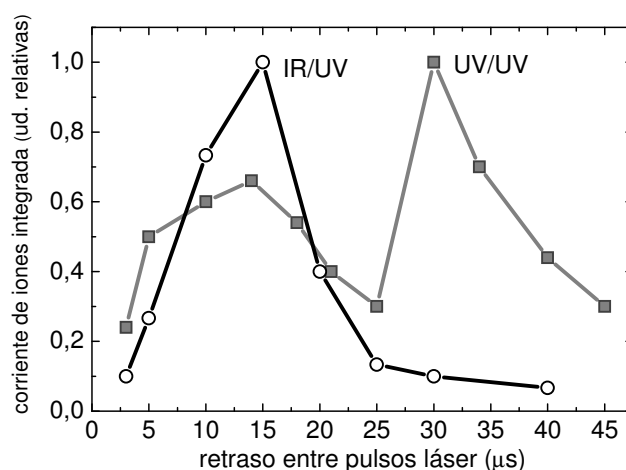


Figura 5.4: Señal integrada de la corriente de iones detectada en los experimentos UV/UV-L2MS e IR/UV-L2MS del asfalto UG8 registrada al aplicar distintos retrasos temporales entre los pulsos láser de desorción y posionización. Las curvas están normalizadas para obtener un valor máximo de uno. Mientras que en los experimentos UV/UV-L2MS se observa la presencia de dos componentes de material eyectado, en los experimentos IR/UV-L2MS sólo se detecta la componente más rápida.

### 5.2.5. Experimentos IR/UV-L2MS

La figura 5.5 muestra los experimentos realizados utilizando pulsos láser del infrarrojo medio ( $3.45\ \mu\text{m}$ ) para desorber asfaltenos en estado neutro y pulsos ultravioleta ( $266\ \text{nm}$ ,  $3\ \text{mJ}$  de energía) retrasados en el tiempo, para ionizarlos. En este caso, los pulsos infrarrojo utilizados en el proceso de desorción se atenuaron para trabajar con energías por pulso de  $0.5\ \text{mJ}$  ( $5\ \text{J cm}^{-2}$  de fluencia). La corriente de iones detectada al aplicar sobre la muestra únicamente el láser de infrarrojo fue despreciable en comparación con la obtenida al aplicar los dos láseres. Una ventaja de esta aproximación es el consumo significativamente menor de muestra en comparación con experimentos IR-LDI.

Mediante la técnica IR/UV-L2MS se obtienen espectros de masas fiables para la determinación del monómero de los asfaltenos, sin la contribución significativa de los agregados a la señal iónica detectada a masas altas, como ilustra la figura 5.5. Tales espectros de masas son de hecho cualitativamente similares a los obtenidos en nuestra investigación en análisis IR-LDI y UV/UV-L2MS y a los obtenidos en los estudios previos de tipo IR-lejano/UV-L2MS descritos en la literatura [13,14].

Entre los experimentos L2MS realizados empleando láseres de infrarrojo o de ultravioleta para la desorción de la muestra, se han encontrado dos diferencias principales.

Por un lado, el uso de radiación láser infrarroja da como resultado espectros LDI de menor resolución en masas como consecuencia de la mayor cantidad de material (neutro e ionizado) que se arranca de la muestra con cada pulso láser, lo que provoca una distribución espacial y de velocidades más ancha de los materiales eyectados en la pluma.

En segundo lugar, la desorción infrarroja da lugar a una sola componente de material eyectado, detectada al aplicar retrasos entre los pulsos de desorción e ionización de entre  $4$  y  $22\ \mu\text{s}$ , en lugar de observarse una distribución bimodal. Estos valores son los mismos que los registrados en el caso de la componente rápida de los experimentos UV/UV-L2MS, sin embargo, no se observa una intensidad significativa de aductos del asfaltano al

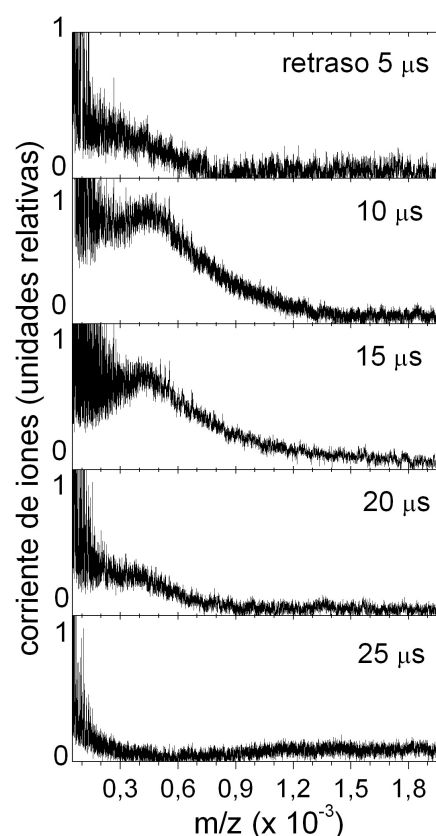


Figura 5.5: **Espectros IR/UV-L2MS del asfaltano UG8** registrados a distintos retrasos temporales entre los pulsos láser de desorción ( $3.45\ \mu\text{m}$  y  $0.5\ \text{mJ/pulso}$ ) y posionización ( $266\ \text{nm}$  and  $3\ \text{mJ/pulso}$ ). Los retrasos aplicados se indican en cada panel.

operar con retrasos superiores a  $25\ \mu\text{s}$ . Este resultado fue corroborado mediante la repetición sistemática de este experimento con distintas muestras, las cuales sí generaban distribuciones bimodales al aplicar la técnica UV/UV-L2MS.

### 5.2.6. Mecanismos de agregación en procesos de desorción láser ultravioleta e infrarroja

Los espectros de masas del asfaltano UG8 obtenidos en el presente estudio a partir de la desorción láser ultravioleta e infrarroja presentan diferencias que sugieren la existencia de mecanismos de desorción distintos en un caso y en otro. Un primer efecto con relevancia analítica sería el hecho de que los

análisis UV-LDI de muestras concentradas producen una gran cantidad de agregados con masas en torno a 1000 m/z y superiores. Tal corriente de iones se suprime significativamente en los experimentos IR-LDI y L2MS, independientemente de que la desorción se realice en el segundo caso mediante radiación láser ultravioleta o infrarroja. Además, los experimentos de desorción/posicionización UV/UV-L2MS han revelado la presencia de al menos dos componentes o grupos de asfaltenos desorbidos de la muestra con velocidades axiales diferentes, en contraposición a la única componente que se detecta en los análisis IR/UV-L2MS.

La agregación en UV-LDI puede producirse a partir de dos mecanismos básicos: (i) la asociación covalente de fotofragmentos de asfaleno [26] o (ii) la formación de agregados de naturaleza no covalente entre iones y neutros en la pluma de desorción. En el caso de los asfaltenos es difícil predecir la eficiencia relativa de la oligomerización de fotoradicales debido a su complejidad y a la presencia de cadenas alifáticas laterales, y se suele considerar que los agregados son mayoritariamente no covalentes; algo que también se aprecia en experimentos de espectrometría de masas con fuentes de electronebulización (ESI) [2, 27].

En un escenario en el cual la ruta de oligomerización covalente fuera dominante, sería inmediato racionalizar el hecho de que la agregación se reduzca dramáticamente al emplear radiación láser infrarroja en el proceso de desorción: la generación de fotofragmentos se reduce significativamente y las únicas especies reactivas se generarían a partir de mecanismos térmicos menos eficientes. Sin embargo, existen argumentos plausibles alternativos para explicar este efecto, basados en el confinamiento térmico y de estrés que son típicos de los procesos de desorción láser infrarroja [21, 23, 24, 28] (pero que no suelen afectar a procesos similares en el UV).

El confinamiento térmico está relacionado con una baja disipación del calor durante la acción del pulso láser, lo que puede provocar el sobrecalentamiento del material irradiado más allá de su temperatura de ebullición, y la vaporización explosiva del mismo [21, 23, 24, 28]. Tal mecanismo de desorción explicaría la supresión de los agregados observados en los análisis IR-LDI realizados en el pre-

sente estudio. En nuestro caso, estimamos que el tiempo requerido para la disipación de la energía puede ser del orden de microsegundos para pulsos láser de infrarrojo y por debajo de microsegundos para pulsos láser ultravioleta<sup>1</sup>. De ahí que en los análisis IR-LDI realizados puedan mantenerse las condiciones de confinamiento térmico, mientras que en el proceso de desorción ultravioleta, puede producirse una disipación más eficaz del calor.

El confinamiento por estrés termoelástico del material irradiado [21, 28] ocurre cuando la duración del pulso láser es menor que el tiempo necesario para la disipación de las ondas de presión formadas por el calentamiento local y diferencial del material irradiado<sup>2</sup>. El resultado es una eyección violenta del material en los estadios iniciales del proceso de desorción, que contribuiría en nuestros experimentos a la disgregación de los *clusters* de asfaleno.

Hemos visto, por otra parte, que en los experimentos de desorción e ionización de neutros (UV/UV-L2MS o IR/UV-L2MS) los efectos de agregación se suprimen significativamente. Esto puede atribuirse a las menores fluencias láser empleadas para desorber los asfaltenos en este tipo de experimentos, dando lugar a plumas poco pobladas, donde se produce un menor enfriamiento me-

<sup>1</sup>la escala de tiempo para la disipación calorífica viene dada por la expresión  $\tau_{th} \approx L_p^2 D_T^{-1}$  donde  $L_p$  hace referencia a la profundidad de penetración del láser y  $D_T$  a la difusividad térmica del material irradiado [21, 28]. El valor de  $L_p$  puede estimarse del orden de varios micrómetros para radiación láser de 3,45  $\mu\text{m}$  y en el rango subnanométrico para radiación de 280 nm. Basándonos en los parámetros termodinámicos típicos del asfalto, el valor de  $D_T$  se encontraría en el rango de  $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .  $\tau_{th}$  toma valores de microsegundos para la radiación infrarroja y por debajo de dicha escala para la radiación ultravioleta. Estos valores son en ambos casos mayores que los 7 ns de duración de los pulsos láser, y las condiciones de confinamiento térmico se han alcanzado, aunque en menor medida en el caso de los pulsos ultravioleta.

<sup>2</sup>La escala de tiempo para la disipación del estrés mecánico a causa de las ondas de presión formadas por el calentamiento local del material viene dada por la expresión  $\tau_{th} \approx L_p v_s^{-1}$  siendo  $L_p$  la profundidad a la que penetra el láser y  $v_s$  la velocidad del sonido en el material [21, 28]. Considerando que  $L_p$  es del orden de varios micrómetros en nuestros experimentos IR-LDI y que  $v_s \approx 2000 \text{ m s}^{-1}$  para los asfaltenos, se obtienen valores de  $\tau_{th}$  de entre 1 y 3 ns. Puesto que la duración de los pulsos láser empleados en este estudio es del mismo orden de magnitud (7 ns), puede esperarse que se produzcan condiciones de confinamiento por estrés del material en el proceso IR-LDI

dian­te colisiones, que provoca una menor estabiliza­ción de los agregados de asfal­teno. Además, se ha argumentado que los aductos neutros pueden experimentar una menor tendencia a formar agregados en comparación con los asfaltenos ionizados producidos en el proceso LDI [13]. Esto sería una consecuencia de las interacciones intermoleculares más débiles que se producen entre los neutros en comparación con las interacciones de tipo dipolo y de carga, más fuertes, introducidas por los compuestos de naturaleza iónica. Tal hipótesis sería también consistente con experimentos UV-LDI previos, que muestran un aumento de la agregación de los asfaltenos cuando las especies iónicas son aceleradas a través del entorno densamente poblado de la pluma al aplicar voltajes de extracción continuos —esto es, cuando no se aplican retrasos entre la generación y la extracción de los iones— [5, 6].

Nos referimos ahora a la desorción de especies con distribuciones de velocidades de al menos dos componentes, observadas en nuestros experimentos UV/UV-L2MS y en los de otros grupos al analizar diversos materiales [8, 29–31].

Una interpretación mecanística, asignaría los componentes más rápidos a una vaporización hipértérmica rápida, y los más lentos a la eyección térmica subsiguiente del material remanente que ha sido irradiado, en forma de aductos más lentos, una vez que se ha producido la disipación del calor [8]. Esta idea sería consistente con la distribución de masas bimodal que se observa en los experimentos UV/UV-L2MS de asfaltenos. Así, la distribución de masas monomérica de la componente rápida sería coherente con el recalentamiento y la rápida vaporización de la muestra, suprimiéndose los efectos de agregación.

La mayor presencia de agregados que se detecta en la segunda componente de la distribución, puede atribuirse a las temperaturas presumiblemente más bajas que se alcanzan en la pluma en estadios más tardíos en el proceso de desorción, y también a las mayores densidades de material desorbido que se alcanzan. De hecho, la integral de la corriente iónica en el máximo de la componente lenta es del orden de 1.5 veces mayor que la integral de la corriente iónica en el máximo de la componente rápida (ver figura 5.4).

En los estudios IR/UV-L2MS realizados en esta investigación se observa una única componente en la distribución de masas de los asfaltenos analizados, similar a la componente rápida detectada en los experimentos UV/UV-L2MS. La ausencia de la componente lenta en nuestras condiciones de trabajo puede relacionarse con la mayor penetración en profundidad del pulso láser infrarrojo en la muestra de asfal­teno. Debido a las condiciones de confinamiento térmico, la mayor parte del volumen de muestra irradiado se calentaría uniformemente y sería vaporizado, quedando poco material activo residual para el segundo paquete de material eyectado.

### 5.3. Conclusiones

El principal objetivo de este estudio ha sido proporcionar una visión global de la viabilidad y limitaciones de los experimentos de desorción/ionización láser (LDI) y de desorción/pos-ionización de neutros (L2MS), acoplados con espectrometría de masas, para la caracterización de las distribuciones de masas de los asfaltenos. Mientras que investigaciones recientes han consolidado estas técnicas en el campo [5, 6, 13, 14, 19, 20], los experimentos que se describen en este capítulo demuestran el amplio intervalo de longitudes de onda que puede aplicarse en este tipo de análisis láser. En particular, la combinación de estos resultados con investigaciones previas muestra que diferentes tipos de láseres, desde los que emiten en el ultravioleta cercano hasta los que lo hacen el infrarrojo lejano serían apropiados para analizar asfaltenos mediante estas técnicas.

La agregación de los aductos de asfal­teno en la pluma continúa siendo el principal efecto que interfiere en la determinación precisa de su distribución de masas. En este sentido, este estudio ha corroborado nuevamente que la agregación ocurre fácilmente en experimentos UV-LDI realizados en muestras de asfal­teno concentradas, coincidiendo con investigaciones previas que establecen que se requiere una alta dilución de los mismos para un análisis preciso UV-LDI [5, 6, 19]. A la vista de los resultados obtenidos en esta investigación, esta precaución no tiene tanta relevancia en experimentos IR-LDI, en los cuales la formación de

agregados se reduce significativamente. La supresión de la formación de *clusters* en este caso se debe presumiblemente a dos efectos complementarios: (i) una reducción drástica de los fragmentos reactivos, que da lugar a una oligomerización covalente y (ii) la pobre estabilización de los agregados no covalentes, debida al recalentamiento del material en condiciones de confinamiento térmico y por estrés, que se producen por la irradiación de la muestra con radiación láser infrarroja. De ahí, que la desorción/ionización láser infrarroja se presente como un método relativamente simple para la caracterización de las distribuciones de pesos moleculares de asfaltenos y otros compuestos derivados del carbono de similar naturaleza.

Cuando se realizan experimentos de desorción/ionización de neutros con dos láseres, del tipo UV/UV-L2MS o IR/UV-L2MS, los efectos de agregación se suprimen significativamente, incluso en muestras densas. Los experimentos L2MS también dependen débilmente de la energía láser empleada para la desorción, siempre que dicho valor se mantenga por debajo del umbral de ionización

del asfalteno. La ausencia de efectos de agregación en experimentos L2MS es una consecuencia fundamentalmente de las menores fluencias láser empleadas para la desorción. Esto resulta en una pluma de desorción de baja densidad, en la que el enfriamiento por colisiones está muy limitado, previniendo la formación de *clusters*.

Los experimentos de tipo UV/UV-L2MS presentan varias ventajas con respecto a los IR/UV-L2MS. Por un lado, un mayor abanico de láseres ultravioleta está disponible comercialmente, permitiendo una implementación de la técnica más sencilla y menos costosa. Al menos para los asfaltenos, la longitud de onda ultravioleta empleada no es crucial debido a la amplia banda de absorción que presentan en este intervalo del espectro. Además, se obtiene una mayor resolución en masas en el intervalo de interés en nuestro estudio ( $\leq 1000$  m/z). Los experimentos UV/UV-L2MS deberían realizarse operando con retrasos temporales cortos entre el láser de desorción y el de ionización. De este modo, sólo se analiza el pulso principal de material desorbido, evitando fácilmente los fenómenos de agregación.

---

## Bibliografía

---

- [1] O.C. Mullins, B. Martínez-Haya, A.G. Marshall. *Contrasting Perspective on Asphaltene Molecular Weight. This Comment vs the Overview of A. A. Herod, K. D. Bartle, and R. Kandiyoti*. Energy & Fuels 22 (3): 1765-1773 (2008)
- [2] O.C. Mullins, E.Y. Sheu, A. Hammami, A.G. Marshall. *Asphaltenes, Heavy Oils, and Petroleomics* (1st edn). Springer: New York, 2006; ISBN-13: 978-0387317342.
- [3] G. Andreatta, N. Bostrom, O.C. Mullins. *High-Q Ultrasonic Determination of the Critical Nanoaggregate Concentration of Asphaltenes and the Critical Micelle Concentration of Standard Surfactants*. Langmuir 21 (7): 2728-2736 (2005)
- [4] K. Indo, J. Ratulowski, B. Dindoruk, J.L. Gao, J.L. Zuo, O.C. Mullins. *Asphaltene Nanoaggregates Measured in a Live Crude Oil by Centrifugation*. Energy & Fuels 23 (9): 4460-4469 (2009)
- [5] A.R. Hortal, B. Martínez-Haya, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa, S. Lago. *On the determination of molecular weight distributions of asphaltenes and their aggregates in laser desorption ionization experiments*. Journal of Mass Spectrometry 41 (7): 960-968 (2006)
- [6] B. Martínez-Haya, A.R. Hortal, P.M. Hurtado, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa. *Laser desorption/ionization determination of molecular weight distributions of polyaromatic carbonaceous compounds and their aggregates*. Journal of Mass Spectrometry 42 (6): 701-713 2007
- [7] L.J. Kovalenko, C.R. Maechling, S.J. Clemett, J.M. Philipoz, R.N. Zare, C.M.O. Alexander. *Microscopic organic analysis using two-step laser mass spectrometry: application to meteoritic acid residues*. Analytical Chemistry 64(6): 682-690 (1992)
- [8] C. Focsa, C. Mihesan, M. Ziskind, B. Chazallon, E. Therssen, P. Desgroux, J.L. Destombes. *Wavelength-selective vibrationally excited photodesorption with tunable IR sources*. Journal of Physics: Condensed Matter 18 (30): S1357 (2006)
- [9] C. Mihesan, M. Ziskind, E. Therssen, P. Desgroux, C. Focsa. *IR laser resonant desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Chemical Physics Letters 423 (4-6): 407-412 (2006)
- [10] C. Mihesan, M. Ziskind, B. Chazallon, E. Therssen, P. Desgroux, S. Gurlui, C. Focsa. *IR wavelength-selective laser desorption via OH and CH stretching modes*. Applied Surface Science 253 (3): 1090-1094 (2006)
- [11] C. Mihesan, M. Ziskind, E. Therssen, P. Desgroux, C. Focsa. *Parametric study of polycyclic aromatic hydrocarbon laser desorption*. Journal of Physics: Condensed Matter 20 (2): 025221 (2008)
- [12] A. Faccinetto, K. Thomson, M. Ziskind, C. Focsa. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 92 (4): 969- (2008)

- [13] A.E. Pomerantz, M.R. Hammond, A.L. Morrow et al. *Two-Step Laser Mass Spectrometry of Asphaltenes*. Journal of The American Chemical Society 130 (23): 7216-7217 (2008)
- [14] A.E. Pomerantz, M.R. Hammond, A.L. Morrow, O.C. Mullins, R.N. Zare. *Asphaltene Molecular-Mass Distribution Determined by Two-Step Laser Mass Spectrometry*. Energy & Fuels 23 (3): 1162-1165 (2009)
- [15] H. Sabbah, A.L. Morrow, A.E. Pomerantz, O.C. Mullins, X. Tan, M.R. Gray, K. Azyat, R.R. Tykwinski, R.N. Zare. *Comparing Laser Desorption/Laser Ionization Mass Spectra of Asphaltenes and Model Compounds*. Energy & Fuels 24 (6): 3589-3594 (2010)
- [16] A.G. Marshall, R.P. Rodgers. *Petroleomics: Chemistry of the underworld PNAS* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 2008, vol. 105, 47:18090-18095.
- [17] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall. *Heavy Petroleum Composition. 1. Exhaustive Compositional Analysis of Athabasca Bitumen HVGO Distillates by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Definitive Test of the Boduszynski Model*. Energy & Fuels 24 (5): 2929-2938 (2010)
- [18] Y.E. Corilo, B.G. Vaz, R.C. Simas, H.D. Lopes Nascimento, C.F. Klitzke, R.C.L. Pereira, W.L. Bastos, E.V. Santos Neto, R.P. Rodgers, M.N. Eberlin. *Petroleomics by EASI( $\pm$ ) FT-ICR MS*. Analytical Chemistry 82 (10): 3990-3996 (2010)
- [19] A.R. Hortal, P.M. Hurtado, B. Martnez-Haya, O.C. Mullins. *Molecular-Weight Distributions of Coal and Petroleum Asphaltenes from Laser Desorption/Ionization Experiments*. Energy & Fuels 21 (5): 2863-2868 (2007)
- [20] P.M. Hurtado, A.R. Hortal, B. Martnez-Haya. *Matrix-assisted laser desorption/ionization detection of carbonaceous compounds in ionic liquid matrices*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21 (18): 3161-3164 (2007)
- [21] K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, A. Leisner, A. Rohlfing, C. Menzel. *Fundamentals of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with pulsed infrared lasers*. International Journal of Mass Spectrometry 226(1): 189-209 (2003)
- [22] M.W. Little, J. Laboy, K.K. Murray. *Wavelength Dependence of Soft Infrared Laser Desorption and Ionization*. Journal of Physical Chemistry C 111 (3): 1412-1416 (2007)
- [23] D.J. Rousell, S.M. Dutta, M.W. Little, K.K. Murray. *Matrix-free infrared soft laser desorption/ionization*. Journal of Mass Spectrometry 39 (10): 1182-1189 (2004)
- [24] C. Menzel, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp. *Mechanisms of energy deposition in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry 207 (1-2): 73-96 (2001)
- [25] Haefliger O. P., Zenobi R. *Laser Mass Spectrometric Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Wide Wavelength Range Laser Multiphoton Ionization Spectroscopy*. Analytical Chemistry 70(13): 2660-2665 (1998)
- [26] A. Cristadoro, H.J. Räder, K. Müllen. *Clustering of polycyclic aromatic hydrocarbons in matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21 (16): 2621-2628 (2007)
- [27] Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. In *Asphaltenes, Heavy Oils and mPetroleomics*; Mullins, O. C., Sheu, E. Y., Hammami, A., Marshall, A. G., Eds.; Springer: New York, 2007; Chapter 3, pp 63-93, DOI: 10.1007/0-387-68903-6.



- 
- [28] L.V. Zhigilei, B.J. Garrison. *Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes*. Journal of Applied Physics 88 (3): 1281-1299 (2000)
- [29] A. Leisner, A. Rohlfing, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd. *Infrared laser post-ionization of large biomolecules from an IR-MALD(I) plume*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry 15 (6): 934-941 (2004)
- [30] W.C. Natzle, D. Padowitz, S.J. Sibenert. *Ultraviolet laser photodesorption of NO from condensed films: Translational and internal energy distributions*. The Journal of Chemical Physics 88 (12): 7975-7995 (1988)
- [31] S.T. Tsai, C.H. Chen, Y.T. Lee, Y.S. Wang. *Desorption dynamics of neutral molecules in matrix-assisted laser desorption/ionization*. Molecular Physics 106(2-4): 239-247 (2008)



## CAPÍTULO 6

---

### Aplicación de líquidos iónicos como matrices MALDI en la detección de hidrocarburos

---

Este breve capítulo aborda el uso de líquidos iónicos como matrices MALDI, evaluando su eficacia en la determinación de distribuciones de masas de asfaltenos. En los últimos años, este tipo de matrices se ha utilizado de forma predominante en el análisis de biomoléculas y polímeros sintéticos, por lo que tanto la complejidad molecular como la polidispersión de los asfaltenos constituye una oportunidad excelente para probar su eficacia en la caracterización de especies complejas derivadas del carbono. Los resultados obtenidos muestran que las distribuciones de masas de los asfaltenos analizados son análogas a las que resultan de estudios realizados con muestras en estado sólido y empleando matrices convencionales. El peso molecular promedio del monómero de asfaltano que se obtiene de esta investigación se encuentra muy por debajo de las 1000 uma., lo que confirma los resultados presentados en capítulos anteriores. Además es interesante resaltar el hecho de que este tipo de matrices suprimen de forma eficiente los efectos de agregación observados en experimentos LDI de asfaltenos y otros compuestos con alta tendencia a agregar entre sí, donde se emplean muestras en estado sólido.



## 6.1. Introducción

La complejidad molecular de los asfaltenos constituye un excelente sistema de referencia en el que probar nuevas estrategias experimentales para la caracterización de compuestos derivados del carbono. En particular, hemos visto que los experimentos LDI-MS proporcionan una ruta válida para estudiar las propiedades microscópicas de este tipo de compuestos y establecer relaciones con el comportamiento físico-químico que exhiben a escala mesoscópica [1].

Buena parte del capítulo 4 se dedicó a perfilar estrategias que garantizaran la fiabilidad de los espectros de masas obtenidos mediante la técnica LDI/MALDI-TOF de compuestos derivados del carbono (PAHs y asfaltenos). En este sentido, se contrastó la eficiencia de diferentes métodos de preparación de muestras para la consecución de dicho objetivo [2]. La preparación de muestras poco concentradas y homogéneamente distribuidas se reveló como un aspecto crucial para evitar los efectos de agregación que experimentan estos compuestos.

En este capítulo se exploran las posibilidades que ofrecen los líquidos iónicos como matrices en experimentos MALDI-MS de asfaltenos. Los líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTIL) son sales orgánicas con un considerable potencial como disolventes “verdes” universales, con numerosas aplicaciones potenciales en la Química moderna [3]. En comparación con los disolventes tradicionales, los RTILs tienen una presión de vapor extremadamente baja —lo que los hace apropiados para trabajar en condiciones de vacío—. La gran variedad de constituyentes que pueden formar parte de su estructura molecular es la causa de que puedan producirse un enorme abanico de interacciones de solvatación en este tipo de sistemas [4–8].

La introducción de los RTILs en experimentos de desorción/ionización láser asistida por matriz es relativamente reciente [9]. En los últimos años se han probado matrices líquidas con distinta funcionalidad para la detección de biomoléculas de diferente naturaleza y polímeros sintéticos [9–14]. Para el análisis de estos analitos ha sido especialmente exitoso el uso de matrices líquidas sinteti-

zadas a partir de matrices MALDI convencionales —generalmente de carácter ácido— combinadas con diversas bases orgánicas [9, 10].

### 6.1.1. Objetivos

El objetivo específico de nuestro estudio es analizar la eficacia de los líquidos iónicos como matrices para la determinación de las distribuciones de masas de un sistema tan complejo como los asfaltenos. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo pueden inspirar futuras aplicaciones para un conjunto más amplio de sistemas moleculares derivados del carbono.

### 6.1.2. Síntesis de líquidos iónicos y preparación de muestras

En el caso que nos ocupa, los líquidos iónicos se sintetizaron en nuestro grupo a partir de mezclas equimolares de compuestos que se utilizan habitualmente como matrices MALDI —como es el caso del 2,4 y 2,5 DHB,  $\alpha$ -CHCA o ácido sinapínico (SA)— junto con bases orgánicas diversas como la piridina, la butilamina, la tributilamina o la N,N-dimetil-etilendiamina (DMED) entre otras. El procedimiento de síntesis es relativamente sencillo y puede llevarse a cabo básicamente de dos formas. La primera consiste en la mezcla de una disolución en metanol del componente ácido con la base orgánica, seguido por un proceso de mezclado mediante ultrasonidos y la completa eliminación del disolvente. Otra alternativa es la combinación de disoluciones stock en acetonitrilo del ácido y la base. La mezcla resultante se utiliza directamente para la preparación de la muestra. El último método tiene el peligro de que un exceso de uno de los dos componentes puede dar lugar a la contaminación del sistema de vacío —por exceso de base—, o bien a la cristalización parcial de la muestra —exceso de ácido—.

Según nuestra experiencia lo más conveniente es disolver conjuntamente cantidades equimolares del ácido y la base en pequeños volúmenes de metanol o acetonitrilo para favorecer la mezcla de los componentes, seguido en su caso por la mezcla con ultrasonidos, y la eliminación del disolvente. Una

vez que el líquido iónico se va a mezclar con el analito de interés, pueden añadirse proporciones variables de metanol o acetonitrilo, para facilitar la incorporación del analito en el seno del líquido iónico, depositar un pequeño volumen sobre el portamuestras, y esperar a la completa evaporación del disolvente. En general, los líquidos iónicos forman capas viscosas sobre el portamuestras, lo cual facilita su adherencia a la superficie del mismo en equipos en el que la muestra tiene una disposición vertical, como ocurre en nuestro caso.

En este estudio hemos empleado como matriz el líquido iónico  $\alpha$ -CHCA/3-aminoquinolina/glicerol (CAG-IL) introducido por Sze y colaboradores [15]. La síntesis del mismo se realizó mezclando el ácido débil  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico con la base 3-aminoquinolina, utilizando glicerol como soporte líquido, en una proporción en peso de 1:4:6 (proporción molar 1:5,2:12,3). La mezcla se trató con ultrasonidos hasta que los distintos componentes se disolvieron completamente y se obtuvo un fluido viscoso amarillo claro. Ocasionalmente, añadimos acetonitrilo en pequeñas cantidades para favorecer la solubilidad de las distintas especies en el seno del líquido.

En estudios previos esta matriz se había utilizado con éxito para la detección mediante la técnica MALDI de biomoléculas [14, 15], pero en el momento en que se realizó este estudio no se tenía conocimiento de que hubiera sido utilizada para la detección de especies derivadas del carbono.

Para este estudio escogimos el asfalto UG8, caracterizado en el capítulo anterior. La solubilidad del asfalto UG8 en la matriz CAG-IL se estudió mediante el análisis de la concentración máxima de asfalto que podía alcanzarse en el líquido antes de que se apreciara la precipitación del mismo por observación directa. El procedimiento consistió en la adición gradual de volúmenes de 1  $\mu$ L de una disolución de asfalto en tolueno (1000 ppm) a la matriz. Del mismo se pudo concluir que podría añadirse hasta una proporción de hasta 1:5 asfalto/matriz en volumen sin precipitación apreciable del asfalto.

Para los experimentos MALDI se prepararon muestras de asfalto/CAG-IL mezclando 3  $\mu$ L de disolución de asfalto con 20  $\mu$ L de matriz. Esta

proporción en volumen supone que tras la evaporación del tolueno, se alcance una concentración de asfalto en la muestra de 150 ppm —o  $\approx 2 \cdot 10^{-4}$  M si se estima un peso molecular promedio del asfalto de  $\approx 700$  uma [16]—. Finalmente, se depositaron sobre el portamuestras alícuotas de 10  $\mu$ L de la mezcla asfalto/CAG-IL, y tras la completa evaporación del tolueno, la muestra se analizó en condiciones de alto vacío.

## 6.2. Discusión de resultados

La figura 6.1 muestra los espectros de absorción ultravioleta de la matriz CAG-IL y el asfalto UG8. Ambos espectros se midieron sobre películas delgadas de los analitos depositadas en placas de cuarzo. En el caso de la matriz CAG-IL la película se extendió directamente sobre la placa, mientras que la de asfalto se consiguió mediante la deposición gradual de gotas en la placa y posterior evaporación del disolvente a temperatura ambiente. La absorbancia de la matriz CAG-IL cubre una región amplia del ultravioleta cercano, por lo que se espera que dicha matriz sea útil en estudios MALDI realizados a cualquier longitud de onda inferior a  $\approx 400$  nm.

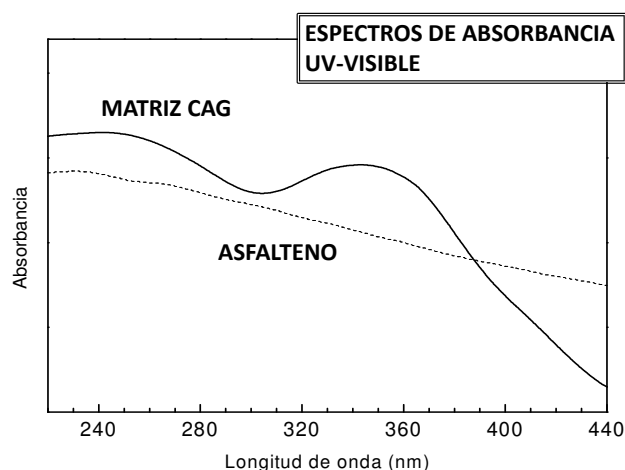


Figura 6.1: Espectros de absorción UV-visible del líquido iónico  $\alpha$ -CHCA / 3-aminoquinolina / glicerol empleado como matriz MALDI y del asfalto UG8. Los espectros se midieron sobre películas delgadas de ambos compuestos depositadas en superficie de cuarzo. En los experimentos MALDI de este trabajo se ha utilizado radiación láser de 300 nm.

La figura 6.2 muestra el espectro MALDI del asfalteno UG8 utilizando CAG-IL como matriz y pulsos láser de 300 nm y 40  $\mu$ J de energía. El ajuste incluido en el espectro real que se obtiene en el experimento se obtuvo mediante una distribución log-normal con dos parámetros ajustables, que se describen en detalle en la referencia [17] y someramente en el capítulo 4. Como puede observarse, la distribución de masas obtenida para el asfalteno UG8 presenta un máximo en torno a 200-300 uma y una cola que decrece lentamente hacia masas superiores ( $\approx 2000$  uma), dando lugar a un peso molecular promedio de  $\approx 710$  uma. En términos generales, la forma global de la distribución de masas medida con la matriz CAG-IL para el asfalteno UG8 coincide con la observada en los experimentos basados en métodos LDI optimizados convencionales, descritos en los capítulos anteriores [16]. Este es un resultado relevante, ya que indica que el RTIL utilizado disuelve eficientemente el asfalteno de forma que se evita la formación de agregados durante la desorción.

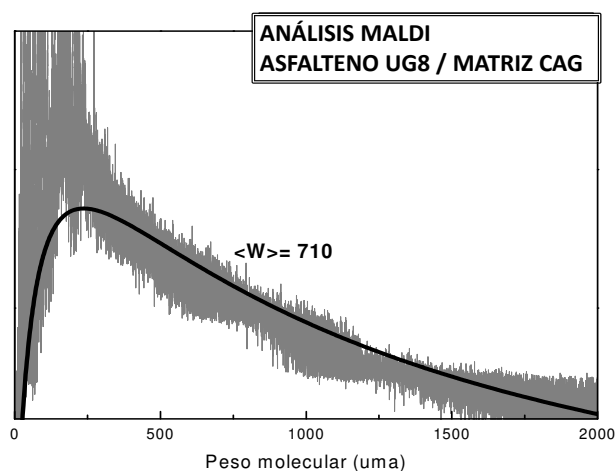


Figura 6.2: **Espectro MALDI del asfalteno UG8 utilizando CAG-IL como matriz.** Radiación láser de 300 nm. Energías por pulso láser de 40  $\mu$ J. La curva suavizada se ha obtenido a partir de la distribución log-normal que se describe en el capítulo 4. Tanto la distribución de masas obtenida como el correspondiente peso molecular promedio reproducen de forma precisa los resultados obtenidos en estudios previos empleando otros métodos de preparación de muestras: (*solvent-free* y *dried-droplet*).

Es importante señalar que la energía láser necesaria para la realización de los experimentos en este

estudio (30-60  $\mu$ J/pulso) fue superior en un factor de 2 a la que se aplica típicamente en análisis de muestras sólidas [16]. La distorsión espectral asociada con las mayores energías láser conduce a un deterioro de la resolución en masas y a una intensa corriente de iones a masas bajas ( $< 250$  uma), asociada a los componentes de la matriz.

En definitiva, los análisis realizados con la matriz CAG-IL muestran una reducida sensibilidad para la detección de asfaltenos si los comparamos con los análisis MALDI típicos de muestras sólidas. Intentos de mejorar el rendimiento MALDI mediante el uso de una matriz alternativa de RTIL basada en el 2,5-DHB (otra matriz común utilizada en MALDI) no mejoraron los presentados en este capítulo.

### 6.3. Conclusiones

De los resultados obtenidos se puede concluir que mediante el uso de líquidos iónicos como matrices MALDI es posible determinar las distribuciones de masas de los asfaltenos —que reproducen fielmente las obtenidas con muestras sólidas convencionales—, demostrándose su eficacia para la detección de especies derivadas del carbono. La dilución del asfalteno que se alcanza en el seno de la matriz es suficiente para evitar los efectos de agregación que experimentan en el proceso LDI, a la vez que se consigue su ionización de forma eficiente.

Mediante el uso de líquidos iónicos también se garantiza la distribución homogénea del analito en la superficie del portamuestras, alcanzándose una mayor reproducibilidad disparo a disparo que con los métodos tradicionales de preparación de muestras. Por el contrario, la resolución en masas y la sensibilidad de los análisis es menor que la obtenida a partir de muestras sólidas convencionales, necesiéndose mayores fluencias láser para conseguir espectros con una relación señal/ruido óptima.

Cabe resaltar que existe una gran variedad de líquidos iónicos que podrían funcionar como matrices MALDI y para los cuales sería deseable la realización de estudios sistemáticos para comprobar su eficiencia frente a distintas familias de analitos.

---

En la actualidad, la comprensión de los procesos de desorción/ionización láser asistidos por matrices líquidas de este tipo es todavía muy pobre.



---

## Bibliografía

---

- [1] M.M. Haley, R.R. Tykwinski (Eds.). *Carbon-Rich Compounds: From Molecules to Materials*. John Wiley & Sons: New York, 2006. ISBN: 978-3527312245.
- [2] B. Martínez-Haya, A.R. Hortal, P.M. Hurtado, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa. *Laser desorption/ionization determination of molecular weight distributions of polyaromatic carbonaceous compounds and their aggregates*. Journal of Mass Spectrometry 42 (6): 701-713 2007
- [3] J.F. Wishart, E.W. Castner. *The physical chemistry of ionic liquids*. Journal of Physical Chemistry B 111(18): 4639-4640 (2007)
- [4] R.D. Rogers, K.R. Seddon. *Ionic liquids—Solvents of the future?* Science 302(5646): 792-793 (2003)
- [5] T. Welton *Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis*. Chemical Reviews 99(88): 2071-2084 (1999)
- [6] J. Dupont, R.F. de Souza, P.A.Z. Suarez. *Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis*. Chemical Reviews 102 (10): 3667-3692 (2002)
- [7] G-B Jiang, J-F Liu, J.A. Jönsson. *Application of ionic liquids in analytical chemistry*. Trends in Analytical Chemistry 24(1): 20-27 (2005)
- [8] J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong. *Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions*. Journal of the American Chemical Society 124: 14247. (2002).
- [9] D.W. Armstrong, L-K Zhang, L. He, M.L. Gross. *Ionic liquids as matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 73(15): 3679-3686 (2001)
- [10] A. Tholey, E. Heinzle. *Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—applications and perspectives*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 386(1): 24-37 (2006)
- [11] M. Zabet-Moghaddam, R. Krüger, E. Heinzle, A. Tholey. *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the characterization of ionic liquids and the analysis of amino acids, peptides and proteins in ionic liquids*. Journal of Mass Spectrometry 39(12): 1494-1505 (2004)
- [12] M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, A. Tholey. *Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18(2): 141-148 (2004)
- [13] M. Mank, B. Stahl, G. Boehm. *2,5-Dihydroxybenzoic Acid Butylamine and Other Ionic Liquid Matrixes for Enhanced MALDI-MS Analysis of Biomolecules*. Analytical Chemistry 76(10): 2938-2950 (2004)

- 
- [14] R. Cramer, S. Corless. *Liquid ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization – mass spectrometry for automated proteomic analysis*. Proteomics 5(2): 360-370 (2005)
  - [15] E.T.P. Sze, T.W.D. Chan, G. Wang. *Formulation of Matrix Solutions for Use in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 9(2): 166-174 (1998)
  - [16] A.R. Hortal, P.M. Hurtado, B. Martnez-Haya, O.C. Mullins. *Molecular-Weight Distributions of Coal and Petroleum Asphaltenes from Laser Desorption/Ionization Experiments*. Energy & Fuels 21 (5): 2863-2868 (2007)
  - [17] A.R. Hortal, B. Martínez-Haya, M.D. Lobato, J.M. Pedrosa, S. Lago. On the determination of molecular weight distributions of asphaltenes and their aggregates in laser desorption ionization experiments. Journal of Mass Spectrometry 2006; 41: 960,

## Parte II

# Interacciones supramoleculares en experimentos de espectroscopia multifotónica resonante en el infrarrojo medio



## CAPÍTULO 7

---

### Introducción

---



## 7.1. Motivación, antecedentes y objetivos generales del bloque

El segundo bloque de esta memoria se centra en la caracterización de los complejos supramoleculares constituidos por poliéteres cíclicos y cationes metálicos (alcalinos) y moleculares (amonio e hidronio) mediante técnicas de espectroscopía láser acopladas con espectrometría de masas. Los experimentos se combinarán con cálculos conformationales químico cuánticos. Aprovecharemos para ello el hecho de que las técnicas modernas de espectrometría de masas permiten la preparación rutinaria y el almacenamiento de forma aislada de complejos iónicos supramoleculares con estequiometría bien definidas [1]. La principal ventaja de esta aproximación es que puede proporcionar una visión microscópica de las interacciones intra e intermoleculares y de las propiedades estructurales del sistema, en relación directa con el modelado computacional.

Los contenidos de este bloque constituyen una prolongación de las líneas de investigación previas de nuestro grupo sobre agregación supramolecular aplicando técnicas LDI/MALDI. En particular, en los últimos años se investigaron los complejos formados por poliéteres lineales y péptidos con cationes alcalinos y metales de transición, lo cual quedó reflejado en la tesis doctoral de nuestra compañera Ana Rodríguez Hortal [2].

Comenzaremos por tanto este capítulo introductorio con una descripción general de los sistemas moleculares que se han estudiado en el pasado reciente y las principales conclusiones obtenidas por nuestro grupo sobre las interacciones polímero-metal. A continuación se abordarán aspectos relacionados con las bases físicas y químicas que rigen las interacciones intra e intermoleculares y que afectan a la geometría molecular, para facilitar la comprensión de la terminología y los conceptos utilizados en la descripción del análisis estructural de los complejos que se desarrolla en capítulos sucesivos. Por último, se describirán las técnicas experimentales y teóricas empleadas para la caracterización de los complejos objeto de estudio: la espectroscopía de disociación multifotónica resonante en el infrarrojo medio y los cálculos mecanocuánticos.

## 7.2. Agregados supramoleculares de éteres–corona

El objetivo final de los trabajos de investigación que se presentan en este bloque es la aplicación de las técnicas de espectroscopía láser al estudio de agregados supramoleculares de naturaleza no covalente, formados por polímeros cíclicos de diversa longitud de cadena (15-crown-5 y 18-crown-6) y cationes alcalinos y moleculares (hidronio y amonio). También se exponen los resultados obtenidos al analizar los complejos formados entre un éter–corona de naturaleza quirál y el catión amonio. La figura 7.1 muestra una representación esquemática de los distintos éteres–corona que se han empleado en esta investigación.

### 7.2.1. Éteres–corona y reconocimiento molecular

Los éteres–corona (en inglés *crown ethers*) son moléculas utilizadas frecuentemente para modelar el comportamiento de los complejos de inclusión con distintos ligandos, por ejemplo, estudiando su afinidad relativa, selectividad o disposición espacial, lo cual es muy importante para avanzar en la comprensión de los procesos de reconocimiento molecular que se producen en sistemas biológicos o químicos complejos.

El concepto de reconocimiento molecular abarca un conjunto de fenómenos controlados por interacciones específicas y de naturaleza no covalente. Estos procesos de reconocimiento están limitados por la forma en que las entidades químicas se reconocen e interaccionan selectivamente entre sí dentro de un entorno químico complejo. En general, el reconocimiento molecular viene definido por el conjunto de interacciones y requerimientos estéricos entre las especies implicadas. En este sentido, es fundamental la complementariedad espacial y química que debe existir entre el huésped y el hospedador (entre un conjunto de moléculas), para que pueda producirse entre ambos una interacción selectiva, de forma perfectamente determinada y ordenada.

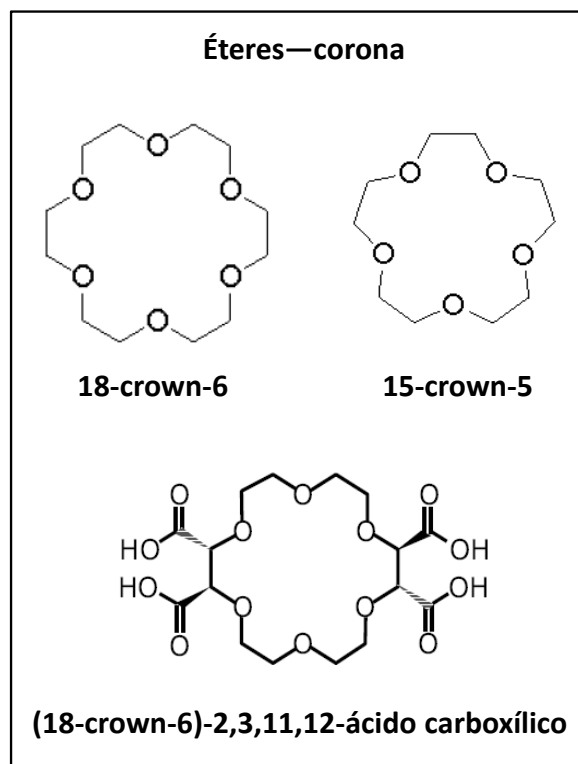


Figura 7.1: **Representación esquemática de los éteres-corona** estudiados en esta investigación: 18-crown-6, 15-crown-5 y (18-crown-6)-2,3,11,12-ácido carboxílico.

La estabilidad de los complejos formados entre poliéteres y cationes metálicos depende de la capacidad del polímero para plegarse en torno al catión, formando un cinturón electronegativo de coordinación, en el que los átomos de oxígeno se orientan hacia el interior de la cavidad en la que se encuentra el metal. La longitud de la cadena y la flexibilidad de la misma, condicionarán el plegamiento necesario para formar la cavidad de coordinación [3]. En el caso de los polímeros cíclicos los grados de libertad son más reducidos que en las cadenas lineales, pero también se produce una distorsión de la estructura cíclica del esqueleto del poliéter al coordinarse los oxígenos dispuestos en el interior de la cavidad con el catión alcalino. En los complejos del éter-corona con los cationes hidronio y amonio se produce una interacción multipodal entre los enlaces N-H del catión y los oxígenos del

anillo, generándose estructuras características que permiten estudiar la importancia relativa de las interacciones tipo puente de hidrógeno y la deslocalización protónica en este tipo de sistemas.

### 7.2.2. Complejos de éteres-corona y cationes alcalinos

La investigación de los complejos polímero-catión en estado gaseoso discrimina la afinidad intrínseca entre el polímero y el catión, obviando los efectos del disolvente, y proporcionando por tanto un método eficaz para la calibración de los métodos teóricos.

La técnica MALDI nos ha permitido realizar estudios en nuestro grupo sobre la afinidad relativa en fase gaseosa entre polímeros y cationes metálicos diversos. Las colisiones en la pluma de desorción posibilitan la estabilización de complejos catiónicos aislados en estado gaseoso [4, 5]. Empleando métodos de preparación de muestras apropiados, como el *solvent-free*, puede garantizarse que los complejos detectados se formen y estabilicen en la pluma de desorción, impidiendo la presencia de complejos preformados en la muestra de partida, como hemos visto en capítulos anteriores.

En la tesis doctoral de Ana Rodríguez Hortal [2] se presentan los resultados y conclusiones de la investigación de la estabilidad relativa de los complejos formados en fase gaseosa entre cationes de distintos metales alcalinos y polietilenglicol (PEG) de diferente longitud de cadena, justificando el interés de tales investigaciones en el amplio abanico de aplicaciones que poseen este tipo de sustancias [6].

El estudio de los complejos poliéter-metal tiene además una gran importancia a nivel fundamental porque implica la comprensión de los parámetros energéticos y conformacionales que sirven como referencia para la modelización molecular [3, 7–10]. Ya se ha indicado que la estabilidad de este tipo de complejos viene determinada fundamentalmente por la habilidad del esqueleto del poliéter de construir una cavidad de coordinación electronegativa —en el caso de polímeros lineales— o de modificar la conformación de la cavidad del ciclo



—en el caso de los éteres–corona—, para favorecer la interacción entre los átomos de oxígeno y el catión alcalino [3, 7–9]. Las restricciones conformationales del éter–corona (longitud y flexibilidad de la cadena del polímero) y el tamaño del catión, determinan la distorsión de la cavidad del éter para formar el complejo de coordinación.

La caracterización estructural de tales complejos es de gran interés para la química supramolecular. En el caso de los éteres de corona cobra particular relevancia el solapamiento entre los pares solitarios de los oxígenos en su coordinación con el catión, aspecto que el PEG es capaz de optimizar en mayor medida debido a su mayor libertad conformacional, como quedó demostrado en nuestros estudios espectroscópicos (IRMPD) de los complejos formados por PEG lineales con los cationes  $\text{Li}^+$  y  $\text{K}^+$ , recogidos en la tesis de Ana Rodríguez Hortal [2, 11].

La selectividad de los complejos formados por éteres–corona y cationes alcalinos en estado gaseoso se ha interpretado a menudo en términos de coincidencia entre el tamaño de la cavidad del éter y el tamaño del catión metálico, de manera que cuanto más próximo sean el tamaño de la cavidad y el tamaño del catión, más favorable será la coordinación entre los oxígenos de la cavidad y el metal. Sin embargo este planteamiento no es del todo correcto. De hecho, en fase gaseosa, independientemente del tamaño de la cavidad, los éteres–corona forman complejos más estables con los cationes alcalinos de menor tamaño, disminuyendo la afinidad por los cationes según aumenta el tamaño de éstos [12–17].

Estudios previos de nuestro grupo en los que se emplea la técnica MALDI-*solvent-free* —presentados en la tesis de Ana Rodríguez Hortal [2]—, corroboran la mayor afinidad de los éteres corona por los cationes alcalinos de menor tamaño. La figura 7.2 [2] muestra dicha tendencia, pudiéndose observar como el pico predominante es siempre el asociado al complejo entre el éter–corona y el catión alcalino de menor tamaño, del par presente en cada muestra.

Los cálculos de energía de enlace de estos complejos encontrados en la bibliografía hasta el momento de realización de estos experimentos tienen

más de una década de antigüedad y se basan en optimizaciones de bajo nivel de cálculo del tipo Hartree-Fock [12, 13, 18]. Estos cálculos apoyan la tendencia mostrada por los resultados experimentales a nivel cualitativo, aunque a nivel cuantitativo, los valores de energía de enlace estimados en las simulaciones son unas cuatro veces mayores que los experimentales.

Motivados por estos antecedentes y con la intención adicional de determinar la estructura en estado gaseoso de los complejos entre diferentes éteres–corona y cationes de diversa naturaleza, nuestro grupo de investigación inició una serie de experimentos espectroscópicos IRMPD y computacionales, parte de los cuales se presentan en los capítulos siguientes. En particular, describiremos los referentes a los complejos del *crown-15* y el *crown-18* con cationes alcalinos y con los cationes amonio e hidronio.

### 7.2.3. Complejos de éteres–corona y cationes moleculares ( $\text{NH}_4^+$ y $\text{H}_3\text{O}^+$ )

La caracterización de los complejos constituidos por éteres–corona y los cationes hidronio y amonio se ha llevado a cabo únicamente mediante espectroscopía IRMPD combinada con cálculos mecanocuánticos. La incorporación de este tipo de cationes en la investigación que nos ocupa se fundamenta en el hecho de que el estudio de los complejos formados por estos cationes y los éteres–corona es crucial para la comprensión de su comportamiento supramolecular en disolventes próticos, y del papel que juega la localización o deslocalización protónica, así como los puentes de hidrógeno, en la estabilización de los complejos en estos sistemas modelo.

Los complejos supramoleculares formados por los éteres–corona y los iones oxonio,  $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$  [19–24], el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) [25–32] y las aminas protonadas,  $\text{RNH}_3^+$ ,  $\text{R}_2\text{NH}_2^+$  [33–39], constituyen áreas de investigación teórica y experimental muy activas en la actualidad. Los éteres–corona son conocidos por estabilizar iones oxonio de tamaños específicos [24], y mostrar una capacidad única para el reconocimiento y la discriminación enantiomérica de aminas y aminoácidos en disolventes próticos. De hecho, un grupo de materiales

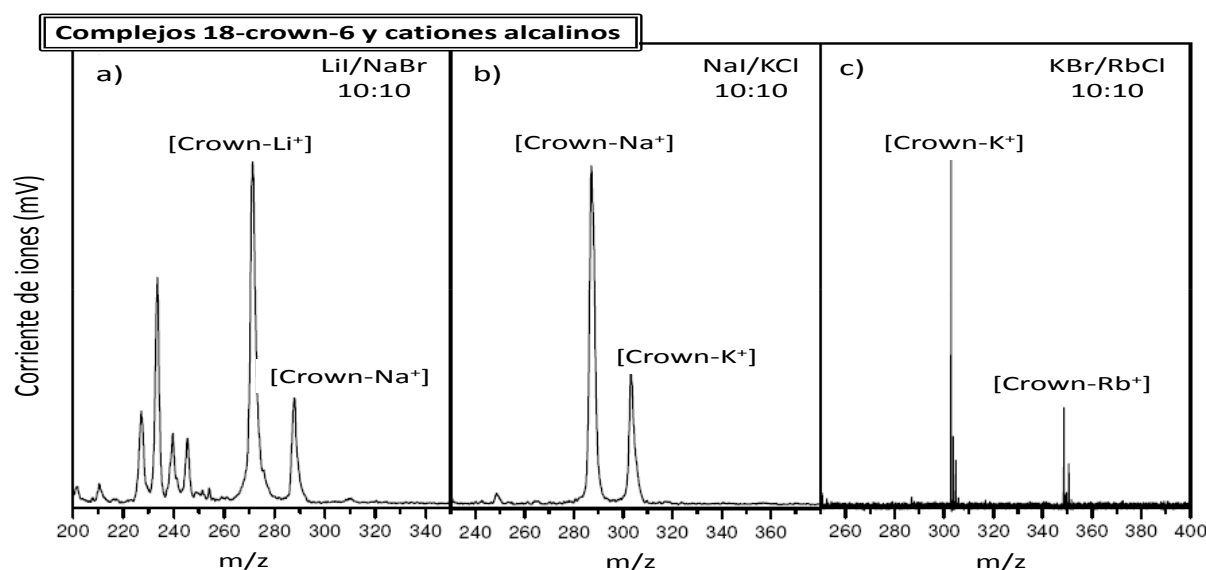


Figura 7.2: Espectros MALDI de muestras *solvent-free* del 18-crown-6 con distintas combinaciones de sales alcalinas de litio, sodio, potasio y rubidio empleadas como agentes cationizantes. Panel a) LiI/NaBr; panel b) NaI/KCl, panel c) KBr/RbCl. En todos los casos la matriz utilizada ha sido el ditranol y la energía por pulso láser de 355 nm es de  $5\mu\text{J}$ .

supramoleculares modernos, como los rotaxanos o familias de complejos fotoactivos, se basan en estas propiedades únicas de reconocimiento de los éteres-corona [25, 26, 28, 39].

En el capítulo 10 se realiza una descripción detallada sobre el estado en que se encuentra la investigación de este tipo de sistemas y lo que se pretende aportar con los estudios llevados a cabo en el marco de este proyecto de tesis doctoral. Igual ocurre en el capítulo 11 en el que se comenta el potencial de los éteres-corona para formar complejos quirales y los principales resultados y conclusiones obtenidos por nuestro grupo en este campo.

### 7.3. Simetría molecular

La simetría molecular jugará un papel importante en los complejos de los éteres de corona abordados en esta tesis, por lo que proporcionaremos en esta sección unos breves fundamentos al respecto, que serán útiles para la discusión de los resultados de nuestra investigación.

De forma general, la simetría es un rasgo ca-

racterístico de las formas geométricas relacionado con su invariancia bajo ciertas transformaciones, movimientos o intercambios. En condiciones formales, decimos que un objeto es simétrico en lo que concierne a una operación matemática dada, si, cuando aplicado al objeto, esta operación no cambia el objeto o su aspecto. Dos objetos son simétricos uno al otro en lo que concierne a un grupo dado de operaciones, si uno es obtenido de otro por algunas operaciones (y viceversa). Aunque existen varios marcos teóricos en los que la simetría molecular puede estudiarse, la teoría de grupos es el principal. Las simetrías que aparecen en química están asociadas a grupos finitos de isometrías.

Dentro de las múltiples técnicas que pueden utilizarse para establecer empíricamente la simetría molecular, destacan la cristalografía de rayos X y varias formas de espectroscopia.

#### 7.3.1. Elementos de simetría

La simetría de una molécula puede describirse según 5 tipos de elementos de simetría, o lo que es lo mismo, según 5 entidades geométricas con

respecto a las cuales se realiza una operación de simetría, y que consisten en rotaciones, reflexiones e inversiones:

1. El **eje de simetría** ( $C_n$ ). Es un eje alrededor del cual una rotación de  $360^\circ/n$  resulta en una molécula indistinguible de la original. Dos ejemplos serían el  $C_2$  en el agua y el  $C_3$  en el amoníaco. Una molécula puede tener varios ejes de simetría, siendo el eje principal el que posee un  $n$  más alto. Al eje principal se le asigna el eje OZ en el sistema de coordenadas cartesianas.
2. El **plano de simetría** o plano especular ( $\sigma$ ). Es un plano de reflexión a través del cual se obtiene una copia idéntica de la molécula original. El agua por ejemplo tiene dos: uno en el plano de la misma molécula y otro perpendicular a él. Un plano de simetría puede identificarse también por su orientación cartesiana:  $(xz)$  o  $(yz)$ .
3. El **centro de simetría** ( $i$ ). Es aquel por el que, para cualquier átomo en la molécula, existe un átomo idéntico diametralmente opuesto.
4. El **eje de rotación-reflexión** ( $S_n$ ). Es un eje alrededor del cual, una rotación de  $360^\circ/n$  seguida de una reflexión en el plano perpendicular a él, deja la molécula sin cambio.
5. La **identidad** ( $E$ ). Consiste en la ausencia de cambio. Toda molécula tiene este elemento, y su consideración es necesaria para la teoría de grupos.

### 7.3.2. Operaciones de simetría

Una operación de simetría es un movimiento de un cuerpo de tal manera que tras el movimiento se obtienen puntos equivalentes o iguales a los que había antes del movimiento. Los 5 elementos de simetría tienen 5 operaciones de simetría asociadas. Así,  $\hat{C}_n$  es la rotación de una molécula alrededor de un eje y  $\hat{E}$  es la operación de identidad. Un elemento de simetría puede tener más de una operación de simetría asociada.

El conjunto de todas las operaciones de simetría de una molécula forma un grupo matemático. Los grupos de simetría de las moléculas se denominan *grupos puntuales*. Existen cinco grandes grupos de simetría y toda molécula pertenece a uno de ellos:

1. Grupos que no tienen ejes  $C_n$ 
  - a)  $C_1$ . La molécula no tiene ningún elemento de simetría.
  - b)  $C_s$ . La molécula sólo tiene un plano de simetría, que es el plano molecular. Las operaciones de simetría son  $\hat{E}$  y  $\hat{\sigma}$ .
  - c)  $C_i$ . La molécula presenta únicamente un centro de inversión.
2. Grupos con un solo eje  $C_n$ 
  - a)  $C_n$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula presenta un único eje  $C_n$ . Los elementos de simetría son  $\hat{C}_n, \hat{C}_n^2, \dots, \hat{C}_n^{n-1}, \hat{E}$ .
  - b)  $C_{nh}$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula presenta un plano de simetría y un eje  $C_n$  perpendicular al mismo. Ya que  $\hat{\sigma}\hat{C}_n=\hat{S}_n$ , el eje  $C_n$  es también el eje  $S_n$ . Si  $n$  es par, el eje  $C_n$  es también  $C_2$  y también es  $S_2$ , lo que implica que la molécula tiene centro de inversión. El grupo  $C_{1h}$  coincide con el grupo  $C_s$ .
  - c)  $C_{nv}$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula tiene un eje  $C_n$  y  $n$  planos de simetría verticales. La intersección de los  $n$  planos forma el eje  $C_n$ .
  - d)  $S_n$  ( $n=4,6,\dots$ ). La molécula presenta un eje  $S_n$ .
3. Grupos con un eje  $C_n$  y  $n$  ejes  $C_2$ 
  - a)  $D_n$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula presenta un eje  $C_n$  y  $n$  ejes  $C_2$  perpendiculares al primero y no presenta ningún plano de simetría.
  - b)  $C_{nh}$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula tiene un eje  $C_n$ ,  $n$  ejes  $C_2$  y un plano de simetría perpendicular al eje  $C_n$ , que es también un eje  $S_n$ . También presentan  $n$  planos de simetría perpendiculares que pasan por los ejes  $C_n$  y  $C_2$ . Si  $n$  es par, el eje  $C_n$  es  $C_2$  y la molécula tiene centro de simetría.

- c)  $D_{nd}$  ( $n=2,3,\dots$ ). La molécula presenta un eje  $C_n$ ,  $n$  ejes  $C_2$  y  $n$  planos de simetría verticales que pasan por el eje  $C_n$  y bisectan los ángulos entre los ejes  $C_2$  adyacentes. Los  $n$  planos verticales reciben el nombre de planos diagonales ( $\sigma_d$ ). El eje  $C_n$  es también un eje  $S_{2n}$ .
4. Grupos con más de un eje  $C_n$  ( $n \geq 2$ ). Estos grupos están relacionados con sólidos que presentan estructuras con polígonos regulares enlazados.
- a)  $T_d$ . La molécula tiene forma de tetraedro regular. Presenta 4 ejes  $C_3$ , tres ejes  $S_4$  y seis planos de simetría.
- b)  $O_d$ . La molécula tiene forma de cubo u octaedro. Tienen centro de simetría, tres ejes  $C_4$ , cuatro ejes  $C_3$ , seis ejes  $C_2$ , tres planos de simetría paralelos a las caras y seis planos de simetría que pasan por aristas opuestas.
- c)  $K_h$  (o  $R_3$ ). Es el grupo de simetría de una esfera. No es importante en moléculas aunque sí lo es en átomos.
- d)  $J_h$ . Es el grupo de simetría asociado al dodecaedro y al icosaedro. No es importante en moléculas.
5. Moléculas lineales. Tienen un eje  $C_\infty$  que coincide con el eje molecular e infinitos planos de simetría que contienen ese eje.
- a)  $C_\infty v$ . La molécula no es simétrica, no presenta centro de simetría.
- b)  $D_\infty v$ . La molécula presenta un centro de simetría. También tiene un plano  $\sigma_h$  e infinitos ejes  $C_2$  perpendiculares al eje  $C_\infty$ .

### 7.3.3. Isomería conformacional y quiralidad

En el ámbito de la química supramolecular los isómeros son aquellas moléculas que se caracterizan por poseer la misma fórmula química (misma composición) pero que difieren en sus propiedades físicas o químicas. En general, podemos hablar de isomería estructural (cuando se producen variaciones en la conectividad de los átomos dentro de la

molécula) o de estereoisomería (cuando no varía la conectividad entre átomos dentro de la molécula, sino su disposición espacial).

Los isómeros estructurales pueden ser sustancias de naturaleza muy diferente, ya que en ellos los átomos están unidos entre sí de manera distinta. En el caso que nos ocupa cobran importancia los estereoisómeros, en los que los átomos están unidos en el mismo orden dentro de las moléculas y éstas se diferencian únicamente por la disposición espacial de los mismos. En este contexto se entienden por *conformeros* las diferentes disposiciones espaciales que pueden adoptar los átomos de una molécula o complejo como resultado de rotaciones y giros alrededor de enlaces que provocan la variación en la orientación espacial de sus componentes.

Las conformaciones diferentes pueden tener diferentes energías, pudiendo interconvertirse con mayor o menor facilidad en función de las barreras energéticas que tengan que superar. En el caso de que existan diferentes *conformeros* próximos en energía, estos serán difícilmente aislables, pudiendo coexistir sus poblaciones.

Existen tres tipos de estereoisomería: conformacional, óptica o configuracional y geométrica. En el primer caso pueden surgir isómeros como resultado del giro en torno a un enlace sencillo (por ejemplo, C-C), mientras que en los otros dos no existe esta posibilidad. La isomería óptica o configuracional sólo se manifiesta como propiedad física, al desviar cada isómero la luz polarizada a la izquierda o la derecha. Los estereoisómeros geométricos surgen ante la imposibilidad de giro de radicales unidos por un doble enlace (por ejemplo, N=N).

Cuando los isómeros ópticos y geométricos son de naturaleza quiral, hablaremos de enantiómeros y diastereoisómeros. La quiralidad en el ámbito de la química es la propiedad que tienen ciertas moléculas de poder existir bajo dos formas no superponibles. En general, un objeto quiral carece de ejes de rotación impropios, y se diferencia de otro aquiral en que tiene actividad óptica, siendo capaz de desviar el plano en el que vibra la luz polarizada. Una de las formas lo desvía a la derecha (R) y la otra a la izquierda (S). El número de estereoi-

sómeros de un compuesto depende del número de centros quirales que posee. La quiralidad se asocia a menudo a la presencia de carbonos asimétricos. Un carbono asimétrico es aquel que se une a cuatro sustituyentes diferentes. A estos carbonos se les denomina centros estereogénicos o estereocentros, aunque existen moléculas quirales que no poseen estos centros, como por ejemplo los bifenilos.

Los enantiómeros son estereoisómeros que se relacionan entre sí por una reflexión, es decir, son imágenes especulares entre sí y no superponibles. Todos los centros estereogénicos o estereocentros en un isómero tienen la configuración opuesta en el otro. Los enantiómeros tienen las mismas propiedades físicas, salvo por la dirección en la que rotan el plano de vibración de la luz polarizada. En muchos compuestos presentes en la naturaleza está presente uno sólo de los dos enantiómeros de infinitud de moléculas, por lo que en el campo de la biología y la química, la quiralidad es una propiedad fundamental que interviene a la hora de describir el papel que juegan los diferentes sistemas en el reconocimiento supramolecular.

Los diastereoisómeros son también quirales pero no son imágenes especulares, no están relacionados por una operación de reflexión. Es el caso por ejemplo de los isómeros *cis* y *trans*, un tipo de isomería ligada habitualmente a la presencia de dobles enlaces entre los átomos de carbono, que implica la restricción de la rotación alrededor del doble enlace, manteniendo los sustituyentes posiciones fijas con respecto a los otros. Por tanto, cuando los sustituyentes en un carbono del doble enlace son iguales, no existiría este tipo de isomería.

## 7.4. Análisis conformacional de complejos supramoleculares

Existen técnicas como la difracción de rayos X o las espectroscopía de resonancia magnética nuclear que proporcionan información sobre la estructura de sistemas moleculares en fases condensadas. Por su parte, la espectroscopía infrarroja combinada con cálculos teóricos posee un gran potencial para el análisis estructural de complejos supramoleculares de forma aislada en fase gaseosa. En este punto realizaremos una descripción de

los fundamentos de la técnicas espectroscópicas y los cálculos mecanocuánticos complementarios necesarios para la caracterización conformacional de agregados moleculares, haciendo mención de las técnicas empleadas para la vaporización de dichos agregados de forma aislada y su ionización no destructiva.

### 7.4.1. Transferencia a la fase gaseosa e ionización de los complejos polímero–catión

A lo largo de las últimas décadas se han realizado grandes avances en el desarrollo de diferentes técnicas para el estudio de macromoléculas y agregados supramoleculares de interés químico, ambiental y biotecnológico.

A finales de los 80, la combinación de la espectrometría de masas con diferentes técnicas de ionización “suave”, como la ionización por electrospray (en adelante ESI, del inglés *electrospray ionization*) o MALDI, supuso una revolución en la detección y caracterización estructural de macromoléculas [40–42], que llevó a la obtención del premio Nobel de Química en 2002 a Koichi Tanaka —por el desarrollo de la técnica MALDI—, John Fenn —por el desarrollo de métodos para la identificación y análisis estructural de macromoléculas biológicas mediante ESI— y Kürt Wüthrich —por la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas en disolución mediante el desarrollo de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear—.

Los métodos de ionización suave, como MALDI, permiten bajo ciertas condiciones la transferencia de complejos supramoleculares de naturaleza no covalente al estado gaseoso, y determinar mediante espectrometría de masas la estequiometría de los mismos, e incluso, los modos y energías de interacción. También es posible mediante esta técnica generar los complejos en la pluma de desorción, controlando determinados parámetros experimentales como ya se ha explicado a lo largo de esta memoria.

Para la formación, transferencia a la fase gaseosa e ionización de los complejos polímero–metal

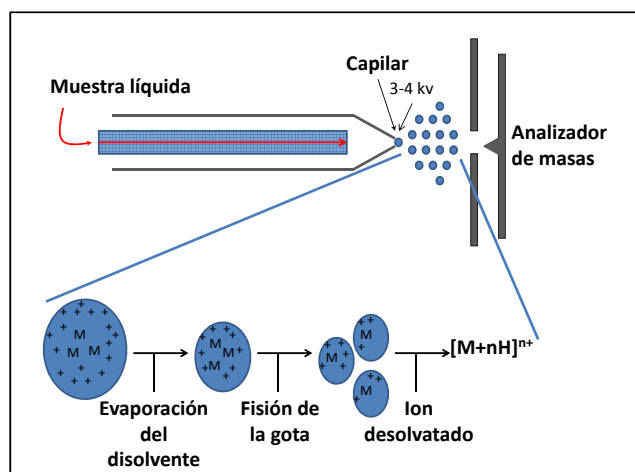


Figura 7.3: **Esquema de ionización por electrospray (ESI).** La muestra en disolución pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica, por ejemplo, un potencial de 3-4 kV y una presión de una atmósfera. Se produce un aerosol de gotas de elevada carga y la evaporación del disolvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa.

analizados en este estudio se ha empleado la técnica ESI. La figura 7.3 muestra un esquema de este tipo de ionización. La técnica ESI produce moléculas ionizadas en fase gaseosa directamente a partir de una disolución líquida. La muestra líquida se transforma en un aerosol de pequeñas gotas cargadas y se introduce en una cámara con nitrógeno que favorece la evaporación del disolvente. Conforme decrece el tamaño de las gotas, la densidad de carga en su superficie se incrementa, obteniéndose moléculas de analito cargadas, generalmente con cargas múltiples. Seleccionando la polaridad del capilar mediante el voltaje que se aplica, pueden generarse iones con carga positiva o negativa. Si en lugar del ion molecular se desea obtener fragmentos del mismo, se pueden inducir procesos fragmentativos aumentando el voltaje en la punta del cono capilar.

#### 7.4.2. Espectroscopia de disociación multifotónica en el infrarrojo medio

El uso de la espectroscopía infrarroja en el contexto de esta tesis se basa en el hecho de que la frecuencia de resonancia de los modos normales de

vibración de las moléculas dependen no sólo de la estructura molecular, sino también de su geometría tridimensional y de las interacciones intra e intermoleculares presentes en el sistema. Nuestra investigación se centrará en la región del infrarrojo medio,  $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ , en la que se detectan los principales modos normales de vibración de los éteres. De forma general, en esta región del espectro, se pueden observar distintos tipos de modos normales de vibración moleculares:

1. tensiones simétricas y asimétricas
2. flexiones simétricas y asimétricas en el plano (*scissoring* y *rocking*, respectivamente)
3. flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (*wagging* y *twisting*, respectivamente)

La técnica de disociación multifotónica resonante (IRMPD, del inglés *InfraRed MultiPhoton Dissociation*) se fundamenta en la fragmentación molecular inducida por la absorción secuencial de múltiples fotones. El proceso se mantiene por la repetida excitación de un estado rovibracional de la molécula y la rápida redistribución de la energía entre todos los modos de vibración del sistema. La eficiencia del proceso requiere la irradiación de las especies iónicas de interés con un láser de infrarrojo de suficiente intensidad que garantice la absorción de un número suficiente de fotones para promover la disociación. Se requieren decenas de fotones para superar el umbral de disociación, dependiendo de los enlaces del ión molecular y de la frecuencia del láser.

Aplicando láseres de infrarrojo sintonizables de alta intensidad como los osciladores paramétricos (descritos en el capítulo 2 de esta memoria), o los láseres de electrones libres (como el empleado en los experimentos espectroscópicos recogidos en este bloque) puede estudiarse la dependencia del proceso con la longitud de onda emitida. El espectro IRMPD resulta de registrar la señal de fotofragmentos producidos en función de la frecuencia del láser.

### 7.4.3. Metodología empleada para la caracterización estructural de los complejos de inclusión de los éteres-corona

Debido a que el proceso de implantación en nuestro laboratorio del sistema experimental adecuado para la realización de experimentos de espectroscopía (para la caracterización conformacional de agregados supramoleculares, por ejemplo) se encuentra en niveles de diseño y montaje, el análisis estructural de los complejos de los éteres-corona con diversos cationes metálicos (alcalinos) y moleculares (hidronio y amonio), se ha llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigación Fundamental de la Materia (FOM Institute for Plasma Physics Rijnhuizen) de Nieuwegein, Holanda. Dicho instituto cuenta con un láser de electrones libres (FELIX) que ponen a disposición de grupos de investigación externos, cuyas propuestas experimentales han sido valoradas positivamente con carácter previo por dicho organismo [43].

En nuestro caso solicitamos el uso de FELIX para la realización de experimentos de espectroscopía multifotónica de disociación en el infrarrojo medio (IRMPD) enfocados a caracterizar estructuralmente los complejos éteres-corona/catión (entre otros sistemas moleculares que quedan fuera del ámbito de esta tesis doctoral), que pudimos realizar en varias campañas.

El sistema FELIX produce radiación láser en un amplio intervalo espectral (3-250  $\mu\text{m}$ ), con un ancho de banda que oscila entre el 0.4 y el 7%, con una energía de 1-50  $\mu\text{J}$  por micropulso y una potencia de 0.5-100 MW. El ritmo de repetición puede fijarse en dos escalas, entre 5 y 10 Hz, y entre 1 GHz y 25 MHz. La polarización del haz es en todos los casos superior al 99%. Toda la información acerca del sistema puede consultarse en la página web que figura en la referencia 1.

Para la realización de nuestros experimentos generamos en primer lugar los complejos iónicos mediante ESI y los espectros IRMPD se registraron en un espectrómetro de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier [44] (FT-ICR, del inglés *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) acoplado con el haz de electrones libres FELIX [43, 45].

La producción de iones por electronebulización (ESI) se realiza en una fuente modificada *Waters Z-Spray* a partir de disoluciones de las sustancias de interés. Generalmente las disoluciones stock las hemos preparado mezclando los éteres-corona y el catión huésped en proporción en peso 1:1, obteniendo disoluciones con una concentración de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> y empleando como disolvente una mezcla metanol/agua (50:50 vol), o metanol/agua/ácido acético (49.5:49.5:1 vol), cuando es necesario estabilizar los complejos de interés en medio ácido.

Los iones producidos de este modo, a temperatura ambiente, se acumulan en una trampa de iones de hexapolo y luego se introducen de forma pulsada en una célula ICR, donde se aíslan y almacenan los de una masa concreta mediante la aplicación de un campo magnético muy intenso que modula la trayectoria de las partículas cargadas (SWIFT, del inglés *Stored Waveform Inverse Fourier Transform*). Un espectrómetro de este tipo se apoya en el hecho de que todos los iones con una misma relación masa/carga tienen la misma frecuencia ciclotrónica, independientemente de su velocidad inicial. Las trayectorias que describen los iones inducen en las placas de detección polarizadas de la célula señales periódicas que, tratadas convenientemente, son procesadas aplicando Transformadas de Fourier (FT), registrándose finalmente los picos de intensidad iónica en función de la relación m/q (espectro ICR).

Los iones seleccionados en masa son irradiados posteriormente con 10 pulsos de FELIX (duración 5  $\mu\text{s}$  y energía de 40 mJ) en el intervalo situado entre 600-1800 cm<sup>-1</sup>. El ancho de banda espectral de la radiación se sitúa alrededor del 0.5 % de la longitud de onda central ( $\approx 5$  cm<sup>-1</sup>). La potencia de salida permite la disociación de complejos con energías de enlace de entre 1 y 5 eV. Una descripción más detallada del procedimiento experimental típico empleado puede encontrarse en la referencia 4. Si la longitud de onda de FELIX a lo largo del intervalo del espectro seleccionado es resonante con un modo vibracional del complejo, ocurre un proceso de absorción multifotónica que da lugar a la disociación del ión padre del complejo, generándose varios canales de fragmentación.

Los espectros IRMPD se construyen representando la corriente de iones que resulta de la diso-

ciación del ión padre del complejo (fragmentativa) en función del número de onda de la radiación incidente. Los espectros registrados se corrigen linealmente para minimizar los efectos de la variación de la energía del pulso láser durante el barrido.

Para poder realizar una asignación conforma-

cional de los espectros obtenidos experimentalmente nuestro grupo ha realizado una serie de cálculos teóricos mecanocuánticos. En cada uno de los capítulos siguientes se incluye un apartado en el que se describe el tratamiento teórico realizado para la asignación conformacional de los complejos de inclusión estudiados en cada caso.



---

## Bibliografía

---

- [1] J.P. Schermann. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier, Amsterdam 2008. ISBN: 978-0-444-52708-0
- [2] A.R. Hortal. *Puesta a punto y aplicación de técnicas láser y de espectrometría de masas para la caracterización de polímeros orgánicos y biológicos y sus agregados no covalentes*. Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales. Universidad Pablo de Olavide.
- [3] K. Shimada, S. Matsuyama, T. Saito, S. Kinugasa, R. Nagahata, S. Kawabata. *Conformational effects on cationization of poly(ethylene glycol) by alkali metal ions in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry 247 (1-3): 85-92 (2005)
- [4] T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Kimoto, R. Arakawa. *Characterization of polyether mixtures using thin-layer chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21 (5): 787-791 (2007)
- [5] K. Dreisewerd. *The Desorption Process in MALDI*. Chemical Reviews 103 (2): 395-425 (2003)
- [6] J.M. Harris, S. Zalipsky. *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. ; ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington, DC, 1997; ISBN-13: 978-0841235373
- [7] G. von Helden, T. Wyttenbach, M.T. Bowers. *Conformation of Macromolecules in the Gas Phase: Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Methods in Ion Chromatography*. Science 267 (5203): 1483-1485 (1995)
- [8] T. Wyttenbach, G. von Helden, M.T. Bowers. *Conformations of Alkali Ion Cationized Polyethers in the Gas Phase: Polyethylene Glycol and Bis[(benzo-15-crown-5)-15-ylmethyl] Pimelate*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 165-166: 377-390 (1997)
- [9] J. Gidden, T. Wyttenbach, A.T. Jackson, J.H. Scrivens, M.T. Bowers. *Gas-Phase Conformations of Synthetic Polymers: Poly(ethylene glycol), Poly(propylene glycol), and Poly(tetramethylene glycol)*. Journal of the American Chemical Society 122 (19): 4692-4699 (2000)
- [10] A.W. Ehlers, C.G. de Koster, R.J. Meier, K. Lammertsma, *MALDI-TOF of Saturated Polyolefins by Coordination of Metal Cations: A Theoretical Study*. Journal of Physical Chemistry 105 (38): 8691-8695 (2001)
- [11] P. Hurtado, A.R. Hortal, F. Gámez, S. Hamad, B. Martínez-Haya. *Gas phase complexes of cyclic and linear polyethers with alkali cations*. Physical Chemistry Chemical Physics 12: 13752-13758 (2010)

- [12] M.B. More, D. Ray, P.B. Armentrout. *Intrinsic Affinities of Alkali Cations for 15-Crown-5 and 18-Crown-6: Bond Dissociation Energies of Gas-Phase  $M^+$ -Crown Ether Complexes*. Journal of American Chemical Society 121 (2): 417-423 (1999)
- [13] P.B. Armentrout. *Cation-ether complexes in the gas phase: thermodynamic insight into molecular recognition*. International Journal of Mass Spectrometry 193 (2): 227-240 (1999)
- [14] D. Feller. *Ab Initio Study of  $M^+$ :18-Crown-6 Microsolvation*. Journal of Physical Chemistry A 101 (14): 2723-2731 (1997)
- [15] S.E. Hill, D. Feller. *Theoretical study of cation/ether complexes: 15-crown-5 and its alkali metal complexes* International Journal of Mass Spectrometry 201 (1-3): 41-58 (2000)
- [16] D.M. Peiris, Y. Yang, R. Ramanathan, K.R. Williams, C. Watson, J.R. Eyler. *Infrared multiphoton dissociation of electrosprayed crown ether complexes*. International Journal of Mass Spectrometry Ion Processes 157-158: 365-378 (1996)
- [17] J.D. Anderson, E.S. Paulsen, D. Dearden. *Alkali metal binding energies of dibenzo-18-crown-6: experimental and computational results*. International Journal of Mass Spectrometry 227 (1): 63-76 (2003)
- [18] E.D. Glendening, D. Feller, M.A. Thompson. *An ab Initio Investigation of the Structure and Alkali Metal Cation Selectivity of 18-Crown-6*. Journal of the American Chemical Society 116 (23): 10657-10669 (1994)
- [19] A. Varnek, G. Wipff, A. Famulari, M. Raimondi, T. Vorobeva, E. Stoyanov. *Complexes of the  $H_5O_2^+$  and  $H_3O^+$  cations with polyethers in water saturated dichloroethane solutions. A combined IR spectroscopic and quantum mechanics study*. Journal of the Chemical Society 2 (5): 887-893 (2002)
- [20] G. Wipff, *Hydronium Ion complex of 18c6: where are the protons? A DFT study of static and dynamic properties*. Journal of the American Chemical Society 124 (16): 4473-4480 (2002)
- [21] M. Bühl, R. Ludwig, R. Schurhammer, G. Wipff. *Hydronium Ion complex of 18c6: theory confirms three "normal" linear H-bonds*. Journal of Physical Chemistry A 108 (51): 11463-11468 (2004)
- [22] E.S. Stoyanov, C.A. Reed. *Unexpected IR characteristics of H-bonds in the 18c6 ether complex of the  $H_3O^+$  Hydronium ion. Can the location of the proton be specified?* Journal of Physical Chemistry A 108 (5): 907-913 (2004)
- [23] J. Kriz, J. Dybal, E. Makrlík, J. Budka. *Interaction of Hydronium Ion with Dibenzo-18-crown-6: NMR, IR, and Theoretical Study*. Journal of Physical Chemistry A 112 (41): 10236-10243 (2008)
- [24] P.C. Junk. *Crown ethers as stabilising ligands for oxonium ions*. New Journal of Chemistry Articles 32 (5): 762-773 (2008)
- [25] S.J. Cantrill, D.A. Fulton, A.M. Heiss, A.R. Pease, J.F. Stoddart, A.J.P. White, D.J. Williams *The influence of Macrocyclic Polyether Constitution upon ammonium Ion/Crown Ether Recognition Processes*. Chemistry - A European Journal 6 (12): 2274-2287 (2000)
- [26] J.W. Jones, H.W. Gibson. *Ion Pairing and Host-Guest Complexation in Low Dielectric Constant Solvents*. Journal of the American Chemical Society 125 (23): 7001-7004 (2003)
- [27] A.D. Bokare, A. Patnaik *Rotational Flexibility in  $NH_4^+$ -Encapsulated 18-Crown-6 Studied by Molecular Dynamics and Positron Annihilation: Where Does the Positron Localize?* Journal of Physical Chemistry A 109 (7): 1269-1271 (2005)

- [28] J.F. Nierengarten, U. Hahn, T.M. Figueira-Duarte, F. Cardinali, N. Solladie, M.E. Walther, A. Van Dorsselaer, H. Herschbach, E. Leize, A.M. Albrecht-Gary, A. Trabolsi, M. Elhabiri. *Ammonium-crown ether interactions for the construction of fullerene-containing photoactive supramolecular devices*. Comptes Rendus Chimie 9 (7): 1022-1030 (2006)
- [29] Ch. Endicott, H.L. Strauss. *Infrared Hole Burning of Crown Ether 18-c-6 Ammonium Ion Complexes*. Journal of Physical Chemistry A 111 (7): 1236-1244 (2007)
- [30] H.J. Buschmann, R.C. Mutihac, E. Schollmeyer. *Complex formation of 18-crown-6 with metal cations and ammonium ions in dioxane-water mixtures*. Thermochimica Acta 472 (1-2): 17-19 (2008)
- [31] S. Ehala, P. Toman, E. Makrlik, V. Kasicka. *Application of affinity capillary electrophoresis and density functional theory to the investigation of benzo-18-crown-6-ether complex with ammonium cation*. Journal of Chromatography A 1216 (45): 7927-7931 (2009)
- [32] P. Toman, E. Makrlik, P. Vanura. *A combined experimental and theoretical study on the complexation of the ammonium ion with benzo-18-crown-6*. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly 141 (3): 301-304 (2010)
- [33] B.L. Williamson, C.S. Creaser. *Non-covalent inclusion complexes of protonated amines with crown ethers*. International Journal of Mass Spectrometry 188 (1): 53-61 (1999)
- [34] R.R. Julian, J.L. Beauchamp. *Site-specific sequestering and stabilization of charge in peptides by supramolecular adduct formation with 18c6 by way of ESI*. International Journal of Mass Spectrometry 210-211: 613-623 (2001)
- [35] M. Schäfer. *Supramolecular Crown Ether Adducts in the Gas Phase: From Molecular Recognition of Amines to the Covalent Coupling of Host/Guest Molecules*. Angewandte Chemie Int. Ed. 42 (17): 1896-1899 (2003)
- [36] M.L. Colgrave, C.J. Bramwell, C.S. Creaser. *Nanoelectrospray ion mobility spectrometry and ion trap mass spectrometry studies of the non-covalent complexes of amino acids and peptides with polyethers*. International Journal of Mass Spectrometry 229 (3): 209-216 (2003)
- [37] R. Franski, G. Schroeder, W. Kamysz, P. Niedzialkowski, T. Ossowski. *Complexes between some lysine-containing peptides and crown ethers electrospray ionization mass spectrometric study*. Journal of Mass Spectrometry 42 (4): 459-466 (2007)
- [38] H. Nagata, H. Nishi, M. Kamigauchi, T. Ishida. *Guest-Dependent Conformation of 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid: Relation to Chiral Separation of Racemic Amino Acids*. Chirality 20 (7): 820-827 (2008)
- [39] H.J. Schneider. *Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes*. Angewandte Chemie Int. Ed. 48 (22): 3924-3977 (2009)
- [40] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C M. Whitehouse. *Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 246 (4926): 64-71 (1989)
- [41] M. Karas, F. Hillenkamp. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons*. Analytical Chemistry 60 (20): 2299-2301 (1988)
- [42] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo. *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2(8): 151-153 (1988)
- [43] FELIX. <http://www.rijnh.nl/felix/>.

- 
- [44] J.J. Valle, J.R. Eyler, J. Oomens, D.T. Moore, A.F.G. van der Meer, G. von Helden, G. Meijer, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall, G.T. Blakney. *Free electron laser-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry facility for obtaining infrared multiphoton dissociation spectra of gaseous ions*. Review of Scientific Instruments 76 (2): 023103 (2005)
- [45] D. Oepts, A.F.G. van der Meer, P.W. van Amersfoort. *The Free-Electron-Laser user facility FELIX*. Infrared Physics & Technology 36(1): 297-308 (1995)

---

### Análisis estructural de los complejos del éter–corona 18Crown6 y cationes alcalinos

---

El 18-crown-6 (18c6) es uno de los éteres–corona nativos de mayor relevancia. Posee un esqueleto molecular cíclico flexible constituido por seis oxígenos, y es conocido por su capacidad para unirse de forma selectiva a diversos cationes metálicos. En este estudio se emplea la espectroscopia infrarroja combinada con cálculos mecanocuánticos para dilucidar la estructura en fase gaseosa de los complejos formados por el 18c6 y los cationes alcalinos. De los resultados obtenidos se concluye que las disposiciones simétricas y quirales juegan un papel dominante en el espacio conformacional del sistema 18c6-M<sup>+</sup>. Los conformeros más estables que se han encontrado exhiben simetrías C<sub>3v</sub> y C<sub>2</sub> para el Cs<sup>+</sup>, D<sub>3d</sub> para el K<sup>+</sup>, C<sub>1</sub> y D<sub>3d</sub> para el Na<sup>+</sup> y D<sub>2</sub> para el Li<sup>+</sup>. Es interesante el hecho de que mientras que el éter–corona 18c6 en estado libre es una molécula aquiral, la quiralidad se manifiesta en las conformaciones C<sub>2</sub> y D<sub>2</sub> de los complejos, en forma de pares de atropoisómeros estables, con potencial de actuar como sustratos con selectividad enantiomérica.



## 8.1. Introducción

Los éteres-corona constituyen sistemas de referencia excelentes para investigar los procesos de reconocimiento molecular mediados por complejos de inclusión.

Durante los años 90 se llevaron a cabo estudios pioneros de carácter experimental de los complejos constituidos por éteres-corona y cationes alcalinos enfocados a la determinación de las energías de enlace implicadas, utilizándose para ello técnicas de espectrometría de masas [1–5] y fragmentativas [2, 6–9].

De aquellos estudios se concluyó que la energía de enlace en estado gaseoso aumentaba al disminuir el diámetro del catión y aumentar el tamaño del políéter cíclico. La cromatografía de movilidad iónica se empleó para explorar la influencia del tamaño de la sección transversal de este tipo de complejos en la inclusión de cationes de diverso tamaño, concluyéndose en estos estudios que el incremento de la sección transversal del confórmero producía una pérdida de efectividad en el proceso de inclusión de los cationes de mayor tamaño en la cavidad del éter-corona [10, 11]. La mayoría de los estudios que se realizaron posteriormente sobre este tipo de complejos en estado gaseoso fueron de naturaleza teórica [12–18].

La determinación de las estructuras de coordinación óptimas que se establecen en los complejos formados por éteres-corona y cationes alcalinos en estado gaseoso, es necesaria para dilucidar la forma en la que interactúan las fuerzas intra e intermoleculares, junto con la flexibilidad y la simetría conformacional del hospedador cíclico, en los procesos de reconocimiento molecular.

El análisis estructural de este tipo de complejos también es útil para hacer predicciones del comportamiento de estos sistemas en disolución. En el caso de disoluciones acuosas, el éter 18-crown-6 (18c6) forma complejos de forma preferente con el  $K^+$  [?, 9, 13]. La unión selectiva surge en este caso porque el catión potasio estabiliza el éter-corona en una configuración abierta que permite la solvatación sin que se produzca una alteración significativa de la estructura de coordinación éter-metal.

Tales estructuras abiertas son adecuadas para la formación de complejos selectivos de tipo pinza, en los que dos éteres-corona están puenteados por el catión alcalino [4, 10, 19]. Por el contrario, la coordinación óptima de los cationes de menor tamaño con los oxígenos del éter ( $Li^+$  y  $Na^+$  para el 18c6) se alcanza en conformaciones cerradas distorsionadas por la incorporación de las moléculas del disolvente de carácter polar, dando lugar a la debilitación del enlace éter-corona—metal.

Desde hace unos años estamos asistiendo al resurgimiento del interés por los estudios experimentales de los éteres-corona en condiciones experimentales bien definidas, gracias en parte al desarrollo de la espectroscopia láser moderna y de las técnicas de espectrometría de masas [19–23]. Nuestro grupo y el presente trabajo, se enmarca dentro de esta corriente.

### 8.1.1. Objetivos

El objetivo de este estudio es la caracterización estructural de los complejos formados por el éter-corona 18-crown-6 y los cationes alcalinos.

Para caracterizar los modos de vibración característicos de los complejos se ha empleado la espectroscopia infrarroja de disociación multifotónica resonante (IRMPD) en la zona del infrarrojo medio y para la asignación conformacional se han cruzado estos estudios con simulaciones teóricas de tipo DFT y MP2.

La flexibilidad del esqueleto molecular del 18c6 hace posible que este adquiera estructuras diversas, mostrando estructuras abiertas al hospedar a los cationes de mayor tamaño, y conformaciones plegadas, de tipo “jaula”, al interaccionar con los cationes más ligeros. Un objetivo específico de esta investigación es profundizar acerca de las características estructurales que hacen posible la competencia entre ambas conformaciones. Complementaremos de esta forma las investigaciones *ab initio* pioneras realizadas por Glendening, Feller y colaboradores hace más de una década [12, 13], y retomadas recientemente por diversos grupos de investigación [17, 18, 23].

## 8.2. Metodología

### Análisis espectroscópicos.

Los complejos  $18c6-M^+$  se han generado mediante ESI a partir de disoluciones 1mM del éter-corona y el cloruro alcalino correspondiente en mezclas de agua/metanol. El análisis experimental ESI-FT-ICR IRMPD de los complejos se ha realizado tal y como se describe en el capítulo ???. Los espectros de infrarrojo que se muestran en este punto representan la corriente de iones procedente de la fragmentación del complejo en función del número de onda de la radiación incidente. Los espectros están corregidos linealmente para eliminar la influencia de los cambios en la energía por pulso láser. En el caso de los complejos  $18c6-Cs^+$  y  $18c6-K^+$  la banda asociada a la vibración del enlace C–O se analizó con energías láser atenuadas para evitar la saturación de la misma.

### Cálculos químico cuánticos.

Todos los cálculos teóricos se han llevado a cabo con el paquete Gaussian 03 [24]. La optimización de la geometría molecular de los distintos conformeros se ha realizado empleando cuatro tipos de cálculos diferentes:

(I) Teoría de la Densidad Funcional con el funcional híbrido B3LYP. Los cationes  $K^+$  y  $Cs^+$  se han modelado empleando los potenciales efectivos (ECP, del inglés *effective core potentials* proporcionados por el grupo de Stuttgart/Dresden [25] para describir los electrones internos (“core”), y para la descripción de los electrones de valencia se han empleado orbitales de tipo Gaussian (GTO). Los átomos de H, C y O se han modelado con la base 6-31G\*. A lo largo del capítulo nos referiremos a este tipo de cálculos como B3LYP/6-31G\*.

(II) Cálculos DFT/B3LYP con potenciales efectivos SDD ECPs para los cationes tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Los átomos de C, O e H se modelaron con la base 6-31++G\*\*. Nos referiremos a estos cálculos como B3LYP/6-31++G\*\*.

(III) Cálculos DFT/B3LYP con una base de cálculo extensa, la cc-pVDZ [26, 27] (*correlation consistent polarized valence*) para todos los áto-

mos. Se denotará en el futuro como B3LYP/cc-pVDZ.

(IV) Cálculos de Moller-Plesset de segundo orden (MP2) [28–30] con potenciales SDD ECPs para el tratamiento de los electrones internos de los cationes K y Cs, tal y como se ha descrito más arriba. Los átomos de C, O e H se modelaron con la base 6-31G\*. Este tipo de simulaciones se denotará como MP2/6-31G\*.

Para reducir errores de superposición de bases se aplicó el método *counterpoise* [31] durante todas las optimizaciones B3LYP. Para los cálculos MP2 el coste computacional de este método fue demasiado alto, lo que motivó que se excluyera la aplicación de tal corrección en este caso.

La búsqueda conformacional inicial se llevó a cabo siguiendo dos rutas diferentes:

(a) Para los complejos  $18c6-Li^*$  y  $18c6-Na^*$  se realizaron series de 40 ps de simulaciones de dinámica molecular de tipo Born-Oppenheimer (BOMD) [32] (temperatura 400 K, tamaño de salto dinámico de 0.25 fs) con un nivel de teoría de Hartree-Fock, empleando la base de cálculo CEP-4G [33, 34]. Se seleccionaron los 20 conformeros de menor energía obtenidos de este modo. A pesar de todos nuestros esfuerzos no fue posible realizar un tratamiento similar de los conformeros con  $K^+$  y  $Cs^*$ .

(b) Se creó también un conjunto de varias estructuras diferentes para los complejos formados por el éter-corona y los cationes  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cs^+$ , empleando información procedente de estudios previos presentes en la literatura consultada, así como la intuición química. Además se utilizaron las conformaciones del éter-corona más estables (entre 3 y 5) encontradas para cada catión alcalino como punto de partida en la optimización conformacional del resto de cationes.

Todos los conformeros seleccionados se optimizaron posteriormente empleando cálculos de tipo B3LYP/6-31G\*. Si los conformeros encontrados estaban cercanos a una clase de simetría dada, entonces se ajustó la disposición del sistema molecular para forzar la simetría y se optimizó nuevamente el conformero (sin ninguna limitación de simetría).



Las estructuras resultantes del cálculo B3LYP/6-31G\* se optimizaron nuevamente aplicando niveles superiores de teoría: MP2/6-31G\* y B3LYP/6-31++G\*\*.

Todas las energías a las que se hace referencia son valores de energía libre de Gibbs, calculadas como la suma de las energías electrónicas más las correcciones debidas a la vibración de punto cero. En dichas correcciones de la energía libre se consideró la temperatura del experimento (300 K) y se constató que cambios del orden de 10 K no tenían ningún efecto en el resultado (variación del valor de energía libre resultante inferior al 0.2 %).

Los espectros teóricos de vibración en el infrarrojo que se muestran más adelante se han calculado a partir de los modos de vibración de las estructuras optimizadas, con un ensanchamiento de línea de 8 cm<sup>-1</sup>. Los factores de escala aplicados a las frecuencias vibracionales calculadas para los complejos 18c6-M<sup>+</sup> (M = Cs, K, Na y Li) fueron 0.972, 0.972, 0.965, y 0.960 para los cálculos B3LYP/6-31++G\*\*; y 0.968, 0.968, 0.965 y 0.960 para los B3LYP/cc-pVDZ, respectivamente.

En capítulos sucesivos no se hará una descripción tan detallada de la metodología empleada en la realización de los cálculos mecanocuánticos puesto que es similar. Se indicará en cada caso el nivel de teoría utilizado y aspectos concretos de cada estudio.

### 8.3. Discusión de resultados

La figura 8.1 muestra el espectro ESI-FT-ICR IRMPD completo registrado experimentalmente para cada uno de los complejos. Esta investigación espectroscópica se centra en la absorción de radiación infrarroja en el intervalo situado entre 800 y 1500 cm<sup>-1</sup> por parte de los complejos, lo que corresponde a la excitación de las transiciones vibracionales asociadas con las tensiones C–O y C–C; la flexión C–O–C; y la flexión, torsión y “wagging” del CH<sub>2</sub> [15]. La tabla 8.1 muestra la asignación de los distintos tipos de modos vibracionales que contribuyen a cada una de las principales bandas que aparecen en los espectros de infrarrojo.

Tabla 8.1: **Asignación de los modos vibraciones correspondientes a las principales bandas observadas en los espectros IRMPD de los complejos 18c6-M<sup>+</sup>.** Se han ordenado de mayor a menor intensidad.

| Banda      | Intervalo (cm <sup>-1</sup> ) | Modo vibracional                               |
|------------|-------------------------------|--|
| <b>I</b>   | 1020-1160                     | tensión C–O                                    |
| <b>II</b>  | 920-980                       | tensión C–C                                    |
| <b>III</b> | 1325-1375                     | “wagging” del CH <sub>2</sub>                  |
| <b>IV</b>  | 1225-1315                     | torsión del CH <sub>2</sub>                    |
| <b>V</b>   | 1440-1490                     | flexión del CH <sub>2</sub>                    |
| <b>VI</b>  | 810-860                       | flexión COC<br>con torsión del CH <sub>2</sub> |

En nuestras condiciones experimentales los complejos del 18c6 con los cationes alcalinos más pesados (K<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>) experimentan durante el proceso IRMPD una fragmentación eficiente por pérdida del catión debido a su relativamente pequeña energía de enlace. Este hecho permite la clara observación de las bandas vibracionales a lo largo de toda la ventana espectral considerada en el estudio. Por el contrario, el marcado carácter endotérmico del canal de disociación de los complejos con Li<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> evita la observación de las bandas más débiles. De acuerdo con los datos computacionales, la energía de enlace de los complejos 18c6-M<sup>+</sup> aumenta alrededor de 200 kJ/mol a lo largo de la serie alcalina, desde el Cs<sup>+</sup> hasta el Li<sup>+</sup>.

La figura 8.1 muestra los espectros que predicen los cálculos B3LYP/6-31++G\*\* y B3LYP/cc-pVDZ. Los espectros calculados que se muestran en la figura están promediados con la contribución de Boltzmann ponderada de los conformeros 18c6-M<sup>+</sup> más estables. Tal ejercicio responde a los diferentes valores de energía libre de los conformeros (mostrados en la tabla 8.2) y no implica ningún parámetro de ajuste. Este aspecto se discutirá en detallé más adelante en este capítulo.

La coincidencia de los espectros teóricos B3LYP/6-31++G\*\* con los espectros obtenidos experimentalmente es excelente en toda la ventana espectral considerada en este estudio, tanto en la posición como en la intensidad relativa de los diferentes bandas vibracionales. La intensidad de las bandas que predicen los cálculos B3LYP/cc-pVDZ también concuerda con el experimento, pero la po-

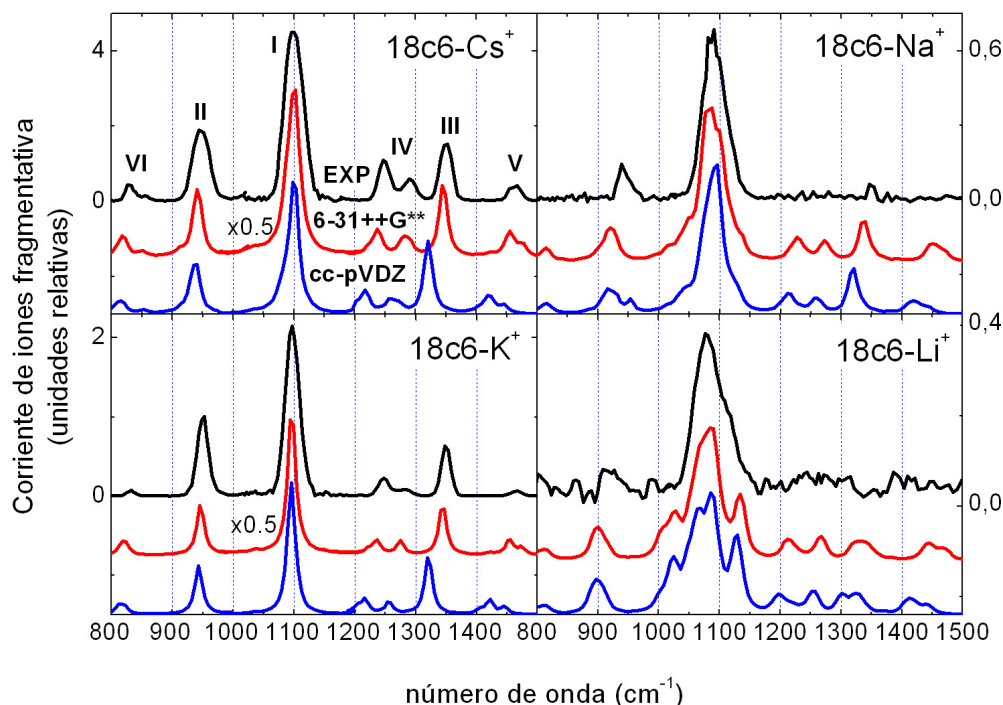


Figura 8.1: **Espectros ESI-FT-ICR IRMPD de los complejos  $18c6-M^+$  ( $M = Cs, K, Na, Li$ ).** Las curvas superiores de cada panel, de color negro, muestran los espectros registrados experimentalmente. Las curvas inferiores, rojas y azules, corresponden a los espectros de absorción infrarroja que predicen los cálculos teóricos B3LYP/6-31++G\*\* y B3LYP/ccpVDZ, respectivamente. El espectro teórico del  $18c6-Cs^+$  está promediado en una proporción poblacional 1:1 a partir de los conformeros  $C_{3v}$  y  $C_2$ ; en el caso del espectro teórico del  $18c6-K^+$  solo se ha considerado el conformero  $D_{3d}$ ; el espectro del  $18c6-Na^+$  se ha promediado a partir de las contribuciones de tres conformeros:  $1C_1$ ,  $D_{3d}$  y  $2C_1$  en una proporción poblacional 1:0.6:0.2; en el caso del espectro teórico del complejo  $18c6-Li^+$  se muestra el del conformero  $D_2$  de forma exclusiva. La asignación de las bandas vibracionales, denotadas con número romanos y ordenadas de mayor a menor intensidad relativa experimental (siendo I la más intensa y VI la más débil) puede observarse en la tabla 8.1. Para los complejos del  $18c6$  con  $Cs^+$  y  $K^+$  la banda asociada a la vibración del CO ( $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ ) se midió con potencias láser atenuadas para evitar efectos de saturación. La intensidad de dicha banda en los espectros teóricos se ha redimensionado aplicando un factor de 0.5, para facilitar la comparación con el experimento.

sición de la bandas vibracionales de mayor frecuencia del  $CH_2$  se desplaza de forma apreciable en relación con la experimental.

Los modos de vibración asociados con la tensión C–O están localizados en el intervalo  $1000-1200\text{ cm}^{-1}$  y representan la banda más prominente de los espectros IRMPD. Estos modos proporcionan un buen sensor para explorar la coordinación que enlaza el catión a los oxígenos de la estructura del poliéter. A lo largo de esta sección se prestará especial atención a los cambios en la envolvente y la posición de la banda de tensión C–O inducidos por las características estructurales de los conformeros

de los diferentes complejos. Esta banda presenta la envolvente más estrecha en el caso del complejo  $18c6-K^+$  ( $\approx 30\text{ cm}^{-1}$ ). En comparación, la banda del CO del complejo con  $Cs^+$ , presenta un ensanchamiento considerable ( $\approx 40\text{ cm}^{-1}$ ). Un efecto similar se observa al comparar las bandas del estimamiento C–C medidas en los complejos  $18c6-Cs^+$  y  $18c6-K^+$  (con anchuras de 35 y 25  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). La banda C–O también se ensancha y se vuelve más estructurada para los cationes más ligeros,  $Na^+$  ( $\approx 50\text{ cm}^{-1}$ ) y  $Li^+$  ( $\approx 70\text{ cm}^{-1}$ ).

Los cálculos teóricos realizados reproducen de forma cualitativa la forma de las bandas y pro-

Tabla 8.2: **Valores de energía libre ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) de los conformeros del  $18\text{c}6\text{-M}^+$  relevantes en este estudio.** Cada conformero se denota de acuerdo con su simetría. En la tabla ?? se muestran los parámetros estructurales que describen los conformeros más estables. A temperatura ambiente, 1 unidad térmica  $k_B T$  equivale a  $2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

| Conformero     | B3LYP 6-31G* | MP2 6-31G* | B3LYP 6-31++G** | B3LYP cc-pVDZ |
|----------------|--------------|------------|-----------------|---------------|
| Cs( $C_{3v}$ ) | 0            | 0          | 0               | 0             |
| Cs( $C_2$ )    | 0.24         | 0.40       | 1.93            | -0.003        |
| K( $D_{3d}$ )  | 0            | 0          | 0               | 0             |
| K( $C_2$ )     | 13.04        | 13.69      | 14.83           | 13.09         |
| Na( $1C_1$ )   | 0            | 0          | 0               | 0             |
| Na( $D_{3d}$ ) | 2.72         | -4.34      | -7.32           | 1.00          |
| Na( $2C_1$ )   | 1.69         | 0.85       | 0.82            | 2.17          |
| Na( $D_2$ )    | 2.38         | 8.39       | 6.15            | 4.03          |
| Li( $D_2$ )    | 0            | 0          | 0               | 0             |
| Li( $C_1$ )    | 3.98         | 3.72       | 3.32            | 2.65          |
| Li( $S_6$ )    | 42.27        | —          | —               | —             |
| Li( $D_{3d}$ ) | 45.12        | —          | —               | —             |

porcionan una explicación para los diferentes ensanchamientos que se observan en el experimento. Como ilustra la figura 8.2 la estrecha banda del CO asociada a los complejos con  $\text{K}^+$  se relaciona con la contribución de un único conformero simétrico, que exhibe una estructura abierta de tipo  $D_{3d}$ . La forma de la banda del complejo con  $\text{Na}^+$  se asocia con la contribución de conformeros de simetría  $C_1$  o  $D_{3d}$ . Finalmente, el ensanchamiento particularmente apreciable de la banda los complejos con  $\text{Li}^+$  puede relacionarse principalmente con un único conformero quiral de estructura cerrada en forma de “jaula” de tipo  $D_2$ .

Lo conformeros  $18\text{c}6\text{-M}^+$  más estables y relevantes para nuestra investigación aparecen representados en la figura 8.3. En la tabla 8.2 se indican los valores de sus energías libres, obtenidos a partir de los dos niveles de teoría empleados en esta investigación. La tabla 8.3 muestra una selección de parámetros geométricos que describen la organización espacial del esqueleto del poliéter y la coordinación oxígeno-catión alcalino para los conformeros más estables que contribuyen potencialmente a los espectros IRMPD registrados.

La descripción desde un punto de vista físico de las características conformacionales de los complejos del  $18\text{c}6$  con los cationes alcalinos implica la explicación de cómo en las conformaciones más estables se maximiza la atracción entre el catión

y los pares solitarios de los oxígenos, a la vez que se minimiza la repulsión de los pares solitarios de los oxígenos entre si. El tamaño relativo del éter-corona y el catión alcalino es de relevancia, puesto que determina el grado de plegamiento de la cadena del poliéter para generar conformaciones con una coordinación óptima. De hecho, la tabla ?? muestra que en los conformeros de menor energía las distancias metal-oxígeno están próximas a la suma del radio de van der Waals del oxígeno ( $\approx 1.5 \text{ \AA}$ ) y el radio iónico del catión alcalino ( $\approx 7, 1.3, 1.0$  y  $0.7 \text{ \AA}$  para el  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , respectivamente).

Los cálculos DFT y MP2 coinciden en las estructuras de equilibrio optimizadas para los conformeros  $18\text{c}6\text{-M}^+$ , excepto por diferencias relativamente pequeñas en los valores absolutos de las distancias y los ángulos de enlace. En la tabla ?? puede verse de forma clara como los cálculos B3LYP/6-31++G\*\* dan lugar de forma sistemática a distancias oxígeno-oxígeno (O-O) más largas, en comparación con las obtenidas con B3LYP/cc-pVDZ. Excepto en el caso del  $\text{Cs}^+$ , esto se compensa con distancias oxígeno-metal (O-M) también más largas. El ángulo del enlace C-O-C, y el ángulo dihedro O-C-C-O son similares en ambas bases. Por otro lado, el cálculo MP2/6-31G\* es cercano a los resultados B3LYP para las estructuras plegadas que se presentan para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Li}^+$ , salvo por el hecho de que predice distancias O-O y O-M y ángulos

Tabla 8.3: Principales parámetros geométricos de los conformeros más estables de los complejos  $18c6-M^+$  que predicen los cálculos B3LYP/6-31++G\*\*, B3LYP/cc-pVDZ y MP2/6-31G\*. Ver la tabla 8.2 para consultar los valores relativos de energía libre para los distintos conformeros y la figura 8.3 para ver la representación gráfica de su estructura. Las distancias (en Angstrom) y los ángulos de enlace que aparecen en el listado comienzan por el oxígeno señalado con un círculo en la figura 8.3 y continúan en sentido horario.

| Conf.          | tipo de Cálculo    | distancias O-M                           | distancias O-O                          | ángulos C-O-C                                 | ángulos dihedro O-C-C-O                       |
|----------------|--------------------|--|---|---|---|
| Cs( $C_{3v}$ ) | B3LYP<br>6-31++G** | 3.136,3.139,3.136,<br>3.139,3.136,3.139  | 2.881,2.881,2.881,<br>2.881,2.881,2.881 | 112.70,114.44,112.70,<br>114.44,112.70,114.44 | 66.24,-66.24,66.24,<br>-66.24,66.24,-66.24    |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 3.177,3.172,3.177,<br>3.172,3.177,3.172  | 2.861,2.861,2.861,<br>2.861,2.861,2.861 | 112.33,114.25,112.33,<br>114.25,112.33,114.25 | 65.84,-65.84,65.84,<br>-65.84,65.84,-65.84    |
|                | MP2<br>6-31G*      | 3.137,3.157,3.137,<br>3.157,3.137,3.157  | 2.841,2.841,2.841,<br>2.841,2.841,2.841 | 111.07,112.70,111.07,<br>112.70,111.07,112.70 | 66.17,-66.17,66.17,<br>-66.17,66.17,-66.17    |
| Cs( $C_2$ )    | B3LYP<br>6-31++G** | 3.192,3.125,3.197,<br>3.192,3.125,3.197  | 2.883,2.934,2.892,<br>2.883,2.934,2.892 | 113.76,114.80,112.67,<br>113.76,114.80,112.67 | -67.70,-64.04,66.67,<br>-67.70,-64.04,66.67   |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 3.232,3.148,3.241,<br>3.232,3.148,3.241  | 2.865,2.913,2.876,<br>2.865,2.913,2.876 | 113.55,114.32,112.25,<br>113.55,114.32,112.25 | -67.50,-62.96,66.42,<br>-67.50,-62.96,66.42   |
|                | MP2<br>6-31G*      | 3.208,3.123,3.203,<br>3.208,3.123,3.203  | 2.849,2.890,2.860,<br>2.849,2.890,2.860 | 111.96,113.08,110.88,<br>111.96,113.08,110.88 | -67.92,-63.38,66.98,<br>-67.92,-63.38,66.98   |
| K( $D_{3d}$ )  | B3LYP<br>6-31++G** | 2.827,2.827,2.827,<br>2.827,2.827,2.827  | 2.840,2.840,2.840,<br>2.840,2.840,2.840 | 113.29,113.29,113.29,<br>113.29,113.29,113.29 | 63.79,-63.79,63.79,<br>-63.79,63.79,-63.79    |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.811,2.811,2.811,<br>2.811,2.811,2.811  | 2.824,2.824,2.824,<br>2.824,2.824,2.824 | 113.10,113.10,113.10,<br>113.10,113.10,113.10 | 63.74,-63.74,63.74,<br>-63.74,63.74,-63.74    |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.798,2.798,2.798,<br>2.798,2.798,2.798  | 2.816,2.816,2.816,<br>2.816,2.816,2.816 | 111.65,111.65,111.65,<br>111.65,111.65,111.65 | 63.64,-63.64,63.64,<br>-63.64,63.64,-63.64    |
| Na( $1C_1$ )   | B3LYP<br>6-31++G** | 2.475,2.490,2.450,<br>2.514,2.495,2.436  | 2.762,2.694,2.713,<br>2.781,2.791,2.721 | 113.34,115.56,115.24,<br>115.37,114.38,115.07 | 60.50,43.44,45.67,<br>62.97,58.51,-56.20      |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.444,2.467,2.431,<br>2.480,2.476,2.412  | 2.742,2.669,2.689,<br>2.757,2.761,2.695 | 115.34,115.34,114.68,<br>115.15,114.21,113.19 | 60.19,41.88,44.34,<br>62.33,56.91,-55.32      |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.458,2.503,2.452,<br>2.513,2.487,2.453  | 2.761,2.674,2.700,<br>2.770,2.801,2.736 | 112.31,114.19,113.87,<br>114.14,113.06,113.17 | 63.38,43.56,46.34,<br>64.56,61.00,-60.08      |
| Na( $D_{3d}$ ) | B3LYP<br>6-31++G** | 2.755,2.755,2.755,<br>2.755,2.755,2.755  | 2.761,2.761,2.761,<br>2.761,2.761,2.761 | 112.51,112.51,112.51,<br>112.51,112.51,112.51 | 60.18,-60.18,60.18,<br>-60.18,60.18,-60.18    |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.730,2.730,2.730,<br>2.730,2.730,2.730  | 2.734,2.734,2.734,<br>2.734,2.734,2.734 | 112.40,112.40,112.40,<br>112.40,112.40,112.40 | 59.18,-59.18,59.18,<br>-59.18,59.18,-59.18    |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.721,2.721,2.721,<br>2.721,2.721,2.721  | 2.731,2.731,2.731,<br>2.731,2.731,2.731 | 110.72,110.72,110.72,<br>112.40,110.72,110.72 | 60.85,-60.85,60.85,<br>-60.85,60.85,-60.85    |
| Na( $2C_1$ )   | B3LYP<br>6-31++G** | 2.506, 2.542,2.456,<br>2.513,2.490,2.499 | 2.856,2.780,2.709,<br>2.767,2.776,2.747 | 114.14,117.18,115.39,<br>112.99,114.89,114.12 | -53.63,55.47,-55.58,<br>60.43,55.23,-59.00    |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.460,2.532,2.422,<br>2.481,2.474,2.461  | 2.830,2.749,2.683,<br>2.745,2.743,2.720 | 114.07,116.57,115.45,<br>112.83,114.72,113.99 | -51.73,53.58,-54.33,<br>59.93,52.84,-57.96    |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.478,2.545,2.480,<br>2.489,2.495,2.499  | 2.827,2.777,2.712,<br>2.760,2.765,2.739 | 113.44,115.65,113.50,<br>111.73,113.71,112.43 | -51.49,57.59,-58.28,<br>62.84,55.26,-61.45    |
| Li( $1D_2$ )   | B3LYP<br>6-31++G** | 2.232,2.119,2.232,<br>2.232,2.119,2.232  | 2.616,2.616,2.755,<br>2.616,2.616,2.755 | 114.94,116.61,114.94,<br>114.94,116.61,114.94 | -40.40,-40.40,-62.17,<br>-40.40,-40.40,-62.17 |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.217,2.102,2.217,<br>2.217,2.102,2.217  | 2.607,2.607,2.752,<br>2.607,2.607,2.752 | 114.79,116.54,114.79,<br>114.79,116.54,114.79 | -39.82,-39.82,-62.17,<br>-39.82,-39.82,-62.17 |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.168,2.063,2.168,<br>2.168,2.063,2.168  | 2.573,2.573,2.736,<br>2.573,2.573,2.736 | 113.77,115.78,113.77,<br>113.77,115.78,113.77 | -39.40,-39.40,-64.01,<br>-39.40,-39.40,-64.01 |
| Li( $C_1$ )    | B3LYP<br>6-31++G** | 2.212,2.134,2.265,<br>2.212,2.138,2.186  | 2.630,2.616,2.730,<br>2.710,2.653,2.805 | 117.29,116.70,115.18,<br>114.53,115.69,114.63 | -40.55,-39.70,-60.17,<br>-53.73,53.26,49.32   |
|                | B3LYP<br>cc-pVDZ   | 2.215,2.117,2.233,<br>2.199,2.123,2.177  | 2.627,2.602,2.726,<br>2.706,2.651,2.807 | 117.14,116.66,115.03,<br>114.40,115.71,114.57 | -40.24,-38.50,-60.06,<br>-53.53,53.62,49.25   |
|                | MP2<br>6-31G*      | 2.174,2.085,2.183,<br>2.147,2.093,2.125  | 2.590,2.567,2.698,<br>2.692,2.634,2.784 | 115.87,116.02,113.91,<br>113.27,114.33,113.66 | -40.93,-38.23,-60.68,<br>-54.55,55.69,48.19   |

C–O–C apreciablemente más pequeños en comparación con las dos aproximaciones B3LYP empleadas para las estructuras moleculares más abiertas encontradas para el  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ .

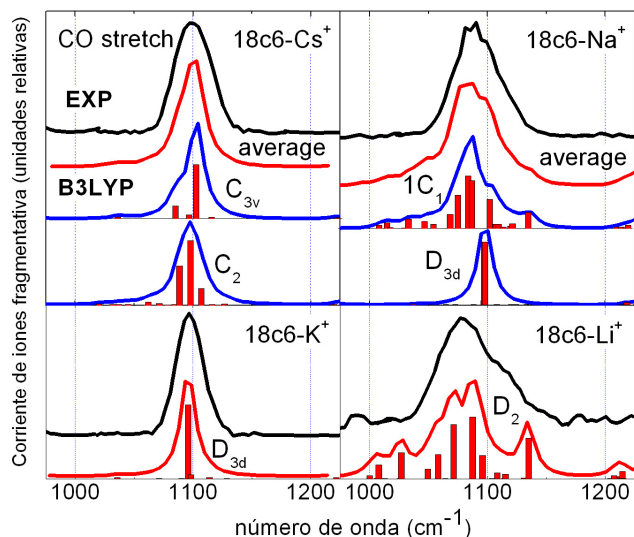


Figura 8.2: Análisis detallado de la banda asociada a la tensión C–O de los complejos 18c6- $\text{M}^+$ . La curva superior de cada panel, de color negro, corresponde al espectro ESI-FT-ICR IRMPD registrado experimentalmente para los complejos 18c6- $\text{M}^+$  ( $\text{M} = \text{Cs}, \text{K}, \text{Na}, \text{Li}$ ). Las curvas inferiores, rojas y azules, corresponden a los espectros de absorción infrarroja que predicen los cálculos teóricos B3LYP/6-31++G\*\*.

En el caso de los complejos con  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Na}^+$  el espectro teórico B3LYP está promediado a partir de la contribución de los espectros de varios conformeros (curva azul). El promedio se ha realizado con proporciones de Boltzmann  $\text{C}_{3v}:\text{C}_2$  1:1 para el  $\text{Cs}^+$  y  $1\text{C}_1:\text{D}_{3d}:2\text{C}_1$  1:0.6:0.2 para el  $\text{Na}^+$ , de acuerdo con sus valores de energía libre (ver tabla 8.2 y no supone la aplicación de ningún parámetro de ajuste). Cada espectro B3LYP se obtiene a partir de la convolución de los modos de vibración teóricos, representados como diagramas de barras en cada caso, con un ensanchamiento de  $8\text{ cm}^{-1}$ .

En los siguientes apartados se discutirán en mayor detalle las características de los diferentes complejos 18c6- $\text{M}^+$ , a la luz de los resultados obtenidos en nuestro estudio teórico y experimental.

### 8.3.1. 18c6- $\text{K}^+$

Comenzaremos discutiendo las características estructurales del sistema 18c6- $\text{K}^+$ , puesto que en este caso hemos encontrado que contribuye al ex-

perimento un único conformero con simetría  $\text{D}_{3d}$ . Este conformero aparece representado en la figura 8.3 y por sí solo describe de forma correcta las bandas vibracionales que aparecen a lo largo del espectro IRMPD, en particular la banda relativamente estrecha asociada al CO.

La estabilidad del conformero  $\text{D}_{3d}$  es resultado de una relación óptima de tamaños entre el catión  $\text{K}^+$  y la cavidad del poliéter: la distancia oxígeno- $\text{K}^+$  ( $2.8\text{ Å}$ ) es prácticamente igual a la suma del radio de van der Waals del oxígeno ( $1.5\text{ Å}$ ) y el radio iónico del  $\text{K}^+$  ( $1.3\text{ Å}$ ). El conformero de simetría  $\text{D}_{3d}$  posee una geometría molecular abierta que es especialmente apropiada para favorecer la hidratación del complejo. Estas consideraciones son consistentes con las expuestas en estudios previos [12, 17, 23], y sirven para entender la selectividad del 18c6 por este catión en disolventes polares [13, 21, 22].

La tabla 8.2 muestra que el siguiente conformero superior en energía (a más de  $13\text{ kJ/mol}$ ) encontrado en nuestra búsqueda conformacional tiene simetría  $\text{C}_2$ . Casualmente, dicho conformero es cualitativamente similar al que se describirá más adelante para el  $\text{Cs}^+$ .

### 8.3.2. 18c6- $\text{Cs}^+$

De acuerdo con los niveles de teoría empleados en este estudio, el complejo 18c6- $\text{Cs}^+$  es estable al adoptar conformaciones de tipo  $\text{C}_{3v}$  y  $\text{C}_2$ , próximas en energía. De hecho, el cálculo B3LYP/cc-pVDZ predice dos conformeros que son prácticamente isoenergéticos (sus valores de energía libre difieren en menos de  $0.003\text{ kJ/mol}$ ).

En trabajos previos se ha postulado la existencia de un único conformero estable, con simetría  $\text{C}_{3v}$  [12, 13, 23]. En tal conformero, el catión  $\text{Cs}^+$  se sitúa a  $1.6\text{ Å}$  por encima del anillo del poliéter, el cual por lo demás, mantiene una configuración plana cercana a la del complejo con potasio ( $\text{D}_{3d}$ ). En el conformero  $\text{C}_{3v}$  el esqueleto del éter está distorsionado con respecto a la estructura  $\text{D}_{3d}$  con el objeto de adaptar la cavidad al tamaño del catión  $\text{Cs}^+$ , dividiendo de ese modo las distancias oxígeno-metal y los ángulos C–O–C en dos valores, mientras que se mantienen los ángulos dihedros.

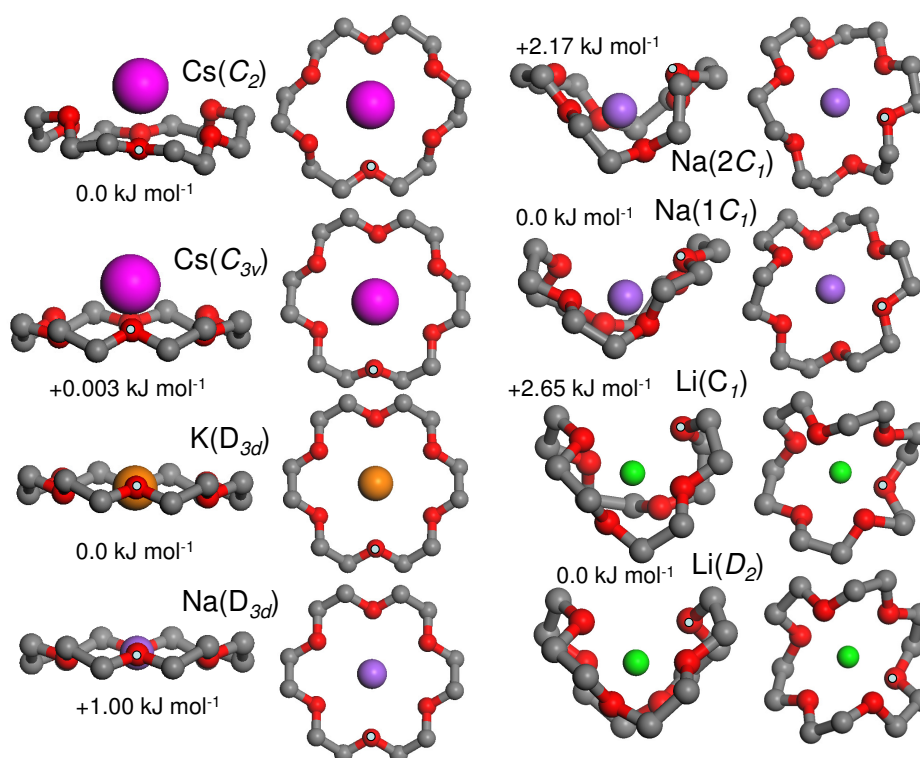


Figura 8.3: **Representación gráfica de la geometría de equilibrio de los complejos 18c6-M<sup>+</sup> que predice el cálculo B3LYP.** Oxígenos en rojo, carbonos en gris. Los hidrógenos se han omitido en la representación para presentar las figuras con mayor claridad. Las energías de enlace B3LYP están indicadas junto a cada complejo (ver tabla 8.2). Uno de los oxígenos del esqueleto molecular del éter-corona está marcado con un círculo relleno para facilitar la visualización de las dos orientaciones moleculares que pueden adoptar cada uno de los complejos. También sirve de guía para la lista de los parámetros estructurales (distancias y ángulos de enlace) que recoge la tabla 8.3.

Una novedad que es interesante resaltar, fruto del presente estudio, es el descubrimiento de un conformero parcialmente plegado ( $C_2$ ) de naturaleza quiral. En este caso, dos pares de oxígenos consecutivos tienden a rodear al catión desde lados opuestos, mientras que dos oxígenos centrales enfrentados actúan como una bisagra e interactúan con el catión desde su base (ver figura 8.3 para mayor claridad). La expulsión parcial del  $\text{Cs}^+$  de la cavidad del éter-corona se debe a que su diámetro iónico, que es más largo, favorece la estabilización de este conformero plegado de simetría  $C_2$ . Esto contrasta con los resultados obtenidos en el caso del complejo éter-potasio, en el que se produce un ajuste excelente entre el tamaño de la cavidad del éter y el catión, y cuyo conformero análogo  $C_2$  es significativamente más energético, como se mencionó anteriormente.

También es interesante el hecho de que el conformero de simetría  $C_2$  para el  $\text{Cs}^+$  logre incrementar la distancia promedio entre los oxígenos vecinos con respecto al conformero  $C_{3v}$ , a costa de aumentar levemente la distancia promedio oxígeno- $\text{Cs}^+$  (ver tabla 8.3).

La figura 8.2 ilustra que los conformeros  $C_{3v}$  y  $C_2$  poseen bandas B3LYP para el estiramiento CO ligeramente desplazadas entre sí, surgiendo cada una de ellas de la contribución de dos a tres modos de vibración individuales. La contribución conjunta de dos conformeros explica el ensanchamiento de las bandas asociadas a los estiramientos C-O y C-C que se observan experimentalmente para el complejo 18c6- $\text{Cs}^+$  en comparación con el complejo con  $\text{K}^+$ .

### 8.3.3. 18c6-Na<sup>+</sup>

El catión Na<sup>+</sup> posee un radio lo suficientemente pequeño como para permitir conformaciones sustancialmente plegadas o cerradas de la estructura de la cadena del 18c6 en torno al catión. El acceso a estructuras cerradas amplía significativamente el abanico conformacional de los complejos 18c6-M<sup>+</sup> alcalino y supone un cambio importante en su caracterización.

La investigación de Glendening y colaboradores quedó inconclusa con respecto al conformero de menor energía encontrado para el complejo 18c6-Na<sup>+</sup>. Su nivel de cálculo más bajo proporcionó un conformero con simetría C<sub>1</sub> como más estable. Sin embargo, el nivel más alto de teoría empleado en esa investigación indicaba que la conformación abierta D<sub>3d</sub> tenía la energía más baja, dando lugar a un complejo 18c6-Na<sup>+</sup> con una estructura cualitativamente similar a la encontrada para el 18c6-K<sup>+</sup> [12]. Nuestros cálculos teóricos son coherentes con estos resultados, ya que mientras que la conformación 1C<sub>1</sub> del Na<sup>+</sup> tenía la energía más baja al utilizar el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*, el conformero de simetría D<sub>3d</sub> era de hecho el más estable sin ninguna duda al aplicar niveles de teoría superiores (B3LYP/6-31++G\*\* y MP2/6-31G\*) como puede verse en la tabla 8.2.

Debemos resaltar sin embargo, que la situación se invierte en el cálculo B3LYP/ccpVDZ, el cual identifica la conformación para el sodio de tipo 1C<sub>1</sub> como la de menor energía. No obstante, en este cálculo el conformero de simetría D<sub>3d</sub> se sitúa tan sólo 1 kJ/mol por encima del 1C<sub>1</sub>, que ocupa el nivel fundamental de energía. Además, un segundo conformero C<sub>1</sub>, Na(2C<sub>1</sub>), aparece entre 2 y 4 kJ/mol por encima del de menor energía, dependiendo del tipo de cálculo empleado.

El espectro IRMPD medido para el complejo 18c6-Na<sup>+</sup> coincide con la predicción teórica de varias conformaciones cercanas. La figura 8.2 muestra que la banda relativamente estrecha asociada con el conformero Na(D<sub>3d</sub>) no explicaría por sí misma la banda CO observada experimentalmente. El ensanchamiento sustancial que se aprecia en la envolvente de la banda es consistente con una contribución de varios conformeros, uno predominante, el 1C<sub>1</sub>, complementado con una contribu-

ción importante del conformero D<sub>3d</sub> y, posiblemente también una pequeña contribución del conformero 2C<sub>1</sub>. El espectro promediado B3LYP para el complejo 18c6-Na<sup>+</sup> que se muestra en las figuras 8.1 y 8.2 ha sido construido a partir de una distribución ponderada de Boltzmann de los conformeros 1C<sub>1</sub>:D<sub>3d</sub>:2C<sub>1</sub> en una proporción 1:0.6:0.2 (sin parámetros de ajuste) y están en excelente acuerdo con el experimento.

El conformero Na(1C<sub>1</sub>) muestra una coordinación particularmente estrecha que se asocia con distancias oxígeno-Na<sup>+</sup> sustancialmente más cortas en el conformero de estructura abierta Na(D<sub>3d</sub>). La estructura Na(1C<sub>1</sub>) resulta de un equilibrio delicado entre las interacciones atractivas (oxígeno-catión) y repulsivas (oxígeno-oxígeno) mediante la adopción de una conformación con una dispersión significativa de las distancias interatómicas, en contraste con la distribución simétrica que presenta el conformero D<sub>3d</sub>. Aparentemente, la descripción precisa de tal equilibrio de fuerzas es particularmente sensible al nivel de teoría empleado. De hecho, a la vista de las evidencias experimentales de este estudio frente a la conformación dominante Na(D<sub>3d</sub>), debemos señalar que los cálculos MP2/6-31G\* y B3LYP/6-31G\*\* predicen que dicho conformero es el más estable, con una energía libre más de 1.5 veces k<sub>B</sub>T inferior a la del conformero Na(1C<sub>1</sub>).

### 8.3.4. 18c6-Li<sup>+</sup>

El catión más pequeño de la serie alcalina es el que puede ser atrapado con más probabilidad en estructuras de tipo jaula formadas por el éter 18c6 con su esqueleto molecular plegado de forma significativa. El pequeño radio iónico del Li<sup>+</sup> da lugar a una interacción desfavorable en el complejo D<sub>3d</sub> (ver la tabla 8.2).

Glendening y colaboradores [12] especulaban que un sistema de tipo jaula en el que los seis oxígenos aparecen implicados podría proporcionar una conformación estable para el complejo 18c6-Li<sup>+</sup>. Tal conformación se caracterizó por una estructura en forma de “barril” con los oxígenos dispuestos por encima y por debajo del catión de forma alternativa en una secuencia oscilante. Aunque tal conformación (conformero Li(S<sub>6</sub>) en la tabla 8.2)



es atrayente, encontramos que se sitúa en un nivel energético muy superior (40 kJ/mol) sobre el conformero más estable de nuestro estudio.

Los cálculos utilizados en nuestra investigación revelan que el conformero más estable para el complejo 18c6-Li<sup>+</sup> posee simetría D<sub>2</sub>. Esto contrasta con nuestra expectativa inicial de que uno o varios conformeros de tipo C<sub>1</sub> contribuirían a la formación de las disposiciones más estables en este caso, de forma análoga a lo que sucede en el sistema 18c6-Na<sup>+</sup>.

El conformero Li(D<sub>2</sub>) exhibe una disposición de tipo “jaula” muy ajustada en torno al catión (ver figuras 8.3 y 8.4). Si nos fijamos en la tabla 8.3 podemos ver que los seis oxígenos que constituyen el poliéter poseen distancias al Li<sup>+</sup> de entre 2.10 y 2.22 amstronsng, esto es, cercanas a la suma del radio iónico del catión (0.7 Å) y el radio de van der Waals del oxígeno (1.5 Å).

Nuestra búsqueda conformacional encontró que el siguiente conformero superior en energía de simetría C<sub>1</sub> se sitúa aproximadamente una unidad kBT completa (2.5-3.0 kJ/mol) por encima del conformero D<sub>2</sub>. La estructura del conformero Li(C<sub>1</sub>) coloca los oxígenos más lejos unos de otros en comparación al conformero Li(D<sub>2</sub>), aunque a costa de incrementar sus distancias con el catión litio. De ello puede extraerse que, a diferencia del caso del Na<sup>+</sup>, la disposición simétrica del complejo 18c6-Li<sup>+</sup> proporciona una coordinación oxígeno-catión más favorable.

La estructura del Li(D<sub>2</sub>) es conformacionalmente cercana a la del complejo Na(1C<sub>1</sub>) más estable (ver figura 8.3). No obstante, la asimetría es beneficiosa en el caso del sodio: el conformero simétrico Na(D<sub>2</sub>), análogo al Li(D<sub>2</sub>), es unos 4 kJ/mol superior en energía al Na(1C<sub>1</sub>) (ver tabla 8.2).

Cálculos específicos B3LYP/6-31++G\*\* mostraron que el conformero Li(D<sub>2</sub>) también está al menos 12 kJ/mol por debajo en energía que la más abierta de las estructuras propuestas en los trabajos más recientes [18, 23].

El complejo Li(D<sub>2</sub>) reproduce la forma de la banda asociada al estiramiento del CO obtenida experimentalmente de forma más precisa que nin-

gún otro de los conformeros identificados en nuestra búsqueda teórica. Mientras que una contribución complementaria del conformero C<sub>1</sub> mejoraría el acuerdo con el experimento, el complejo D<sub>2</sub> por sí solo, da lugar a una interpretación plausible del espectro IRMPD obtenido experimentalmente.

Como muestra la figura 8.2, la forma ensanchada de la banda del CO puede relacionarse con la división de las frecuencias vibracionales en el intervalo de componentes asociados con la acción conjunta de los modos de vibración simétricos y asimétricos de los seis grupos C–O–C.

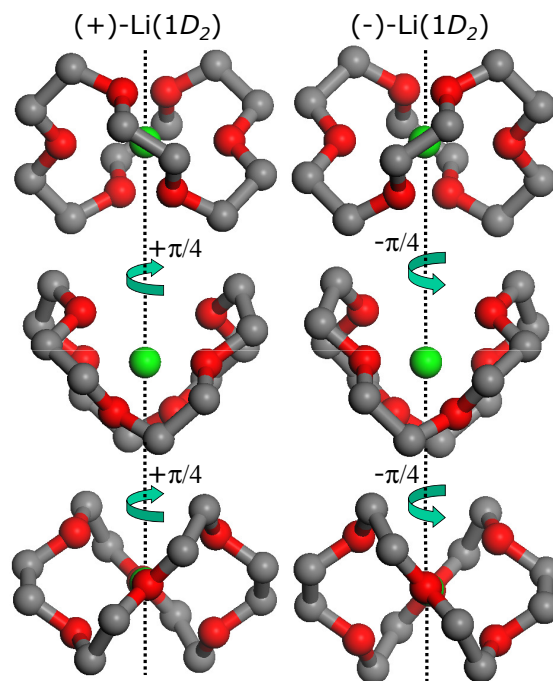


Figura 8.4: Representación gráfica de la geometría de equilibrio que predice el cálculo B3LYP/6-31++G\*\* para los dos atropoisómeros del complejo 18c6-Li(D<sub>2</sub>). Las tres vistas que se presentan de cada atropoisómero se obtienen mediante giros secuenciales de  $\pi/4$  efectuados en sentidos opuestos en cada isómero, e ilustran la quiralidad del complejo. Oxígenos en rojo, carbonos en gris. Los hidrógenos se han omitido para proporcionar mayor claridad a la figura. Ver la tabla ?? para consultar la lista de los parámetros estructurales más relevantes de este complejo.



### 8.3.5. Atropoisomerismo

Puesto que las disposiciones simétricas de tipo  $C_2$  y  $D_2$  son implícitamente quirales, la formación de un complejo estable  $18c6-Li^+ D_2$ , junto con el complejo  $18c6-Cs^+ C_2$  descrito más arriba, induce quiralidad en el sistema éter-corona/catión-alcalino. El políéter 18c6 no posee quiralidad intrínseca por sí mismo, surgiendo atropoisómeros quirales tras acomplejarse con el metal [35]. La figura 8.4 ilustra la flexión simétrica fuera del plano (*wrapping*) de naturaleza quiral del esqueleto del éter alrededor del catión litio para los atropoisómeros (+) y (-) del conformero  $Li(D_2)$ . A diferencia de lo que ocurre en estructuras moleculares con quiralidad intrínseca, los atropoisómeros pueden transformarse el uno en el otro mediante rotaciones internas de los enlaces. Sin embargo, las barreras energéticas de transición de tal transformación son altas en comparación con la energía térmica a temperatura ambiente. Como consecuencia, de los atropoisómeros  $Li(1D_2)$  y  $Cs(C_2)$  puede esperarse que constituyan sustratos estables con potencial para la selectividad enantiomérica del huésped.

## 8.4. Conclusiones

La combinación de la espectroscopia infrarroja de disociación multifotónica y cálculos mecánico-cuánticos nos ha permitido aportar nueva información acerca de las características conformacionales de los complejos más estables (de menor energía) formados por el éter-corona 18-crown-6 y cationes de metales alcalinos. Tales conformaciones maximizan las fuerzas atractivas entre el catión y los pares de electrones solitarios de los oxígenos de la estructura del políéter, a la vez que minimizan las repulsiones de estos últimos entre sí. Esto se consigue mediante estructuras del esqueleto del éter-corona de tipo abierto en el caso de los cationes de mayor tamaño,  $Cs^+$  y  $K^+$ , y estructuras plegadas en torno al catión, en el caso de los más pequeños,  $Na^+$  y  $Li^+$ .

Las estructuras de menor energía presentan disposiciones del complejo con distancias metal-oxígeno cercanas a la suma del radio de van der Waals del oxígeno y el radio iónico del catión alcalino. La flexibilidad del esqueleto molecular del éter-corona

y las restricciones de la simetría son la clave del abanico conformacional de los complejos  $18c6-M^+$  y suponen un importante cambio en la descripción teórica de estos complejos. La investigación que nos ocupa ha establecido que los conformeros más estables para los complejos del éter-corona con los diferentes cationes alcalinos corresponden a disposiciones simétricas y de naturaleza quiral, excepto para el caso del  $Na^+$ .

El espectro del  $18c6-K^+$  se asignó de forma consistente a la conformación simétrica casi plana  $D_{3d}$ , con el catión situado en el centro de masas del anillo del éter. Las características espectrales del complejo  $18c6-Cs^+$  quedan descritas con la contribución de dos conformeros, uno de tipo  $C_{3v}$  y otro con estructura  $C_2$  con cuatro oxígenos plegados hacia el catión, el cual en ambos casos, se sitúa sobre el plano de la cadena del éter-corona. Para el  $Na^+$ , la contribución del conformero abierto  $D_{3d}$  y de uno o dos conformeros con plegamiento asimétrico de tipo  $C_1$  parece la más probable para explicar los resultados experimentales. Finalmente, la unión del catión  $Li^+$  da lugar de forma dominante a conformaciones plegadas de simetría  $D_2$ . Este conformero  $D_2$   $18c6-Li^+$  y el conformero  $C_2$   $18c6-Cs^+$  son quirales y generan pares de atropoisómeros con potencial para la selectividad enantiomérica al interaccionar con estructuras moleculares quirales.

Las conformaciones plegadas del éter encontradas en fase gas para los complejos con los cationes más ligeros deben mantener su estabilidad en disolventes de baja polaridad. Por otro lado, estructuras abiertas, más accesibles a la hidratación parcial del catión, ganan relevancia en disolución acuosa. Este aspecto ha sido explorado en una investigación reciente en el momento de realización de esta investigación, basada en la espectroscopia infrarroja asociada al marcaje con argón llevada a cabo por el grupo de J. M. Lisy [21, 22].

Las características conformacionales de los complejos  $18c6-M^+$  obtenidas en esta investigación contribuyen a la consolidación del 18c6 como modelo para la comprensión y tratamiento experimental y teórico de los complejos de inclusión que poseen esqueletos moleculares del hospedador flexibles, permitiendo la adopción de conformaciones distintas en función del huésped con el que interactúe.



---

## Bibliografia

---

- [1] I.H. Chu, H. Zhang, D. Dearden. *Macrocyclic chemistry in the gas phase: intrinsic cation affinities and complexation rates for alkali metal cation complexes of crown ethers and glymes*. Journal of the American Chemical Society 115 (13): 5736-5744 (1993)
- [2] D.M. Peiris, Y. Yang, R. Ramanathan, K.R. Williams, C. Watson, J.R. Eyler. *Infrared multiphoton dissociation of electrosprayed crown ether complexes*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 157/158: 365-378 (1996)
- [3] S.M. Blair, E.C. Kempen, J. Brodbelt. *Determination of binding selectivities in host-guest complexation by electrospray/quadrupole ion trap mass spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry 9 (10): 1049-1059 (1998).
- [4] J.B. Nicoll, D.V. Dearden. *Reactions of multidentate ligands with ligated alkali cation complexes: self-exchange and "sandwich" complex formation kinetics of gas phase crown ether-alkali cation complexes*. International Journal of Mass Spectrometry 204 (1-3): 171-183 (2001)
- [5] J.D. Anderson, E.S. Paulsen, D. Dearden. *Alkali metal binding energies of dibenzo-18-crown-6: experimental and computational results*. International Journal of Mass Spectrometry 227 (1): 63-76 (2003)
- [6] S. Maleknia, J. Brodbelt. *Gas-phase selectivities of crown ethers for alkali metal ion complexation*. Journal of The American Chemical Society 114 (11): 4295-4298 (1992)
- [7] S. Maleknia, J. Brodbelt. *High energy collision-induced dissociation of alkali-metal ion adducts of crown ethers and acyclic analogs*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 6 (6): 376-381 (1992)
- [8] P.B. Armentrout. *Cation-ether complexes in the gas phase: thermodynamic insight into molecular recognition*. International Journal of Mass Spectrometry 193 (2-3): 227-240 (1999)
- [9] M.B. More, D. Ray, P.B. Armentrout. *Intrinsic Affinities of Alkali Cations for 15-Crown-5 and 18-Crown-6: Bond Dissociation Energies of Gas-Phase M+-Crown Ether Complexes*. Journal of The American Chemical Society 121 (2): 417-423 (1999)
- [10] T. Wyttenbach, G. von Helden, M.T. Bowers. *Conformations of alkali ion cationized polyethers in the gas phase: polyethylene glycol and bis[(benzo-15-crown-5)-15-ylmethyl] pimelate*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 165/166: 377-390 (1997)
- [11] S. Lee, T. Wyttenbach, G. von Helden, M.T. Bowers. *Gas Phase Conformations of Li+, Na+, K+, and Cs+ Complexed with 18-Crown-6*. Journal of The American Chemical Society 117 (40): 10159-10160 (1995)

- [12] E.D. Glendening, D. Feller, M.A. Thompson. *An Ab Initio Investigation of the Structure and Alkali Metal Cation Selectivity of 18-Crown-6*. Journal of The American Chemical Society 116 (23) 10657-10669 (1994)
- [13] D. Feller. *Ab Initio Study of  $M^+ : 18\text{-Crown-6}$  Microsolvation*. The Journal of Physical Chemistry A 101 (14): 2723-2731 (1997)
- [14] S.E. Hill, D. Feller. *Theoretical study of cation/ether complexes: 15-crown-5 and its alkali metal complexes*. International Journal of Mass Spectrometry 201 (1-3): 41-58 (2000)
- [15] S. Al-Rusaese, A.A. Al-Kahtani, A.A. El-Ahzhary. *Experimental and Theoretical Study of the Vibrational Spectra of 12-Crown-4-Alkali Metal Cation Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A 110 (28): 8676-8687 (2006)
- [16] H.S. Kim. *Selectivity of 18-Crown-6 between  $\text{Cs}^+$  and  $\text{Rb}^+$  Ion: Solvent Effect by a Monte Carlo Simulation Study*. The Journal of Physical Chemistry B 108 (31): 11753-11759 (2004)
- [17] M. Gajewski, J. Tuszynski, H. Mori, E. Miyoshi, M. Klobukowski. *DFT studies of the electronic structure and geometry of 18-crown-6, hexaaza[18]annulene, and their complexes with cations of the heavier alkali and alkaline earth metals*. Inorganica Chimica Acta 361 (7): 2166-2171 (2008)
- [18] S. De, A. Boda, M. Ali. *Preferential interaction of charged alkali metal ions (guest) within a narrow cavity of cyclic crown ethers (neutral host): A quantum chemical investigation*. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM 941 (1-3): 90-101 (2010)
- [19] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, J.D. Steill, J. Oomens, P.J. Merklings. *Spectroscopic Investigation of the Gas-Phase Conformations of 15-Crown-5 Ether Complexes with  $\text{K}^+$* . The Journal of Physical Chemistry A 113 (27): 7748-7752 (2009)
- [20] V.A. Shubert, W.H. James III, T.S. Zwier. *Jet-Cooled Electronic and Vibrational Spectroscopy of Crown Ethers: Benzo-15-Crown-5 Ether and 4'-Amino-Benzo-15-Crown-5 Ether*. The Journal of Physical Chemistry A 113 (28): 8055-8066 (2009)
- [21] J.D. Rodriguez, J.M. Lisy. *Infrared spectroscopy of gas-phase hydrated  $\text{K}^+ : 18\text{-crown-6}$  complexes: Evidence for high energy conformer trapping using the argon tagging method*. International Journal of Mass Spectrometry 283 (1-3): 135-139 (2009)
- [22] J.D. Rodriguez, T.D. Vaden, J.M. Lisy. *Infrared Spectroscopy of Ionophore-Model Systems: Hydrated Alkali Metal Ion 18-Crown-6 Ether Complexes*. Journal of The American Chemical Society 131(47): 17277-17285 (2009)
- [23] J.D. Rodriguez, D. Kim, P. Tarakeshbar, J.M. Lisy. *Exploring Gas-Phase Ion-Ionophore Interactions: Infrared Spectroscopy of Argon-Tagged Alkali Ion-Crown Ether Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A 114 (3): 1514-1520 (2010)
- [24] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, S.A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople. *Gaussian 03, revisión C.02*. Gaussian Inc.: Wallingford, CT, 2004.

- [25] D. Andrae, U. Häußler, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuß. *Energy-adjusted *ab initio* pseudopotentials for the second and third row transition elements*. Theoretica Chimica Acta 77 (2): 123-141 (1990)
- [26] T.H. Dunning Jr. *Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen*. The Journal of Chemical Physics 90 (2): 1007-1023 (1989)
- [27] R.A. Kendall, T.H. Dunning Jr., R.J. Harrison. *Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions*. The Journal of Chemical Physics 96 (9): 6796-6806 (1992)
- [28] C. Møller, M.S. Plesset. *Note on an approximation treatment for Many-Electron Systems*. Physical Review 46 (7): 618-622 (1934)
- [29] M. Head-Gordon, J.A. Pople, M.J. Frisch. *MP2 energy evaluation by direct methods*. Chemical Physics Letters 153 (6): 503-506 (1998)
- [30] M. Head-Gordon, T. Head-Gordon. *Analytic MP2 frequencies without fifth-order storage. Theory and application to bifurcated hydrogen bonds in the water hexamer*. Chemical Physics Letters 220 (1-2): 122-128 (1994)
- [31] S.F. Boys, F. Bernardi. *The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors*. Molecular Physics 19 (4): 553-566 (1970)
- [32] T. Helgaker, E. Uggerud, H.J.A. Jensen. *Integration of the classical equations of motion on *ab initio* molecular potential energy surfaces using gradients and Hessians: application to translational energy release upon fragmentation*. Chemical Physics Letters 173 (2-3): 145-150 (1990)
- [33] W.J. Stevens, H. Basch, M.J. Krauss. *Compact effective potentials and efficient shared-exponent basis-sets for the 1<sup>st</sup>-row and 2<sup>nd</sup>-row atoms*. Journal of Chemical Physics 81 (12): 6026-6033 (1984)
- [34] M. Krauss, W.J. Stevens. *Effective core potentials and accurate energy curves for Cs<sub>2</sub> and other alkali diatomics*. The Journal of Chemical Physics 93 (6): 4236-4242 (1990)
- [35] V.V. Yakshin, O.M. Vilkova, S.A. Kotlyar, R. Ya Doklady. *Crown Ether Atropoisomers in Metal Ion Extraction Processes*. Physical Chemistry 379 (1-3): 176-178 (2001)



### Análisis estructural de complejos del éter–corona 15Crown5 y cationes alcalinos

---

La flexibilidad del esqueleto de los macrociclos constituye un aspecto clave que condiciona el reconocimiento molecular. Esta investigación aborda la caracterización de los complejos formados en estado gaseoso por el éter–corona 15-crown-5 (15c5,  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_5$ ) y los metales alcalinos más pesados (K, Rb, Cs). Los resultados se comparan con los obtenidos previamente en nuestro grupo a partir del análisis de complejos de cadenas lineales de polietilenglicol y cationes alcalinos. El estudio utiliza la espectroscopía de disociación multifotónica en el infrarrojo medio ( $800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ) combinada con cálculos teóricos basados en la Teoría de Densidad Funcional para la caracterización estructural de los complejos. Los espectros registrados de los complejos  $15\text{c}5\text{--M}^+$  se corresponden con estructuras piramidales asimétricas, en las cuales cuatro oxígenos del anillo del éter se orientan hacia el catión. Esta distorsión, necesaria para que el anillo del 15c5 optimice su coordinación con el catión alcalino, contrasta con las conformaciones más relajadas que adoptan las cadenas lineales al envolver al catión.





## 9.1. Introducción

El descubrimiento de los éter-corona (*crown-ethers*), y sobre todo de su especificidad a la hora de establecer enlaces con otros sistemas, inició el desarrollo de la química macrocíclica moderna [1, 2]. Entre estas características moleculares, que dirigen la selectividad en la formación de complejos, destacan el tamaño y la flexibilidad del anillo del éter. Ambos son responsables de la habilidad del macrociclo para construir estructuras de coordinación para cationes específicos de forma óptima.

En las dos últimas décadas se ha realizado un número significativo de estudios experimentales [2–6, 8–18] y teóricos [19–24] sobre los complejos generados en fase gaseosa entre políéters y metales alcalinos. En el ámbito de la investigación que nos ocupa, son los experimentos de espectrometría de masas de movilidad iónica realizados por Bowers y colaboradores, los que presentan una mayor relevancia [2, 8, 9]. En dichos experimentos se concluyó que en los complejos del  $\text{Na}^+$  con cadenas de polietilen-, polipropilen- y politetrametilenglicol los polímeros presentaban una coordinación con el catión con un número decreciente de oxígenos, lo cual se atribuyó a las diferencias en la separación existente entre los oxígenos en la estructura del éter (polietileno frente a politetrametileno) y a efectos estéricos asociados a la presencia de grupos metilo laterales (polietileno frente a polipropileno) [9].

En investigaciones más recientes se ha utilizado la espectroscopia infrarroja acoplada con diversas técnicas de espectrometría de masas para caracterizar en mayor detalle los aspectos conformacionales de los complejos políéter-cationes alcalinos generados en estado gaseoso [3, 16, 17], incluyendo complejos hidratados [18].

La caracterización estructural de los complejos formados por el 18-crown-6 (18c6) con la serie de cationes alcalinos realizados en nuestro grupo y descritos en detalle en el capítulo anterior [3], pusieron de manifiesto la capacidad del éter 18c6 de adoptar tanto conformaciones plegadas como abiertas, con un elevado grado de simetría ( $D_{3d}$ ,  $C_{3v}$ ,  $D_2$ ,  $C_2$ ) e incluso quiralidad. En este caso,

nos ocupamos de un ciclo de 5 oxígenos y por tanto más limitado en sus posibles simetrías conformacionales, lo cual constituye uno de los principales aspectos de interés de esta investigación.

### 9.1.1. Objetivos

El objetivo de este estudio es la caracterización estructural de los complejos formados por el éter-corona 15-crown-5 y los cationes alcalinos  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ .

Profundizaremos en el análisis de las características conformacionales de los complejos mediante la comparación de la disposición espacial que adoptan los políéters cíclicos y lineales al formar complejos con metales alcalinos de distinto tamaño. Los políéters lineales son capaces de generar conformaciones estables con mayores órdenes de coordinación que los éteres cíclicos, a costa de reducir la especificidad de la unión políéter-catión [3].

En concreto se abordará la comparación de los resultados obtenidos con las conclusiones de estudios IRMPD de los complejos formados por éteres lineales [25] —concretamente polietilen-glicol:  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$  con  $n = 4$  (PEG4) y  $n = 9$  (PEG9)— y  $\text{K}^+$ , realizados por nuestro grupo y descritos en detalle en la tesis de nuestra compañera Ana Rodríguez Hortal [26].

Puesto que el PEG4 posee el mismo número de oxígenos que el 15c5, la comparación de ambos sistemas debería ilustrar el papel que juega la flexibilidad de la cadena del políéter en la optimización de la estructura de coordinación. Por su parte, la investigación de los complejos PEG9- $\text{K}^+$  puede proporcionar información acerca del máximo número de átomos de oxígeno que pueden coordinar con el catión.

## 9.2. Metodología

### Análisis espectroscópicos.

Los complejos del éter-corona con los cationes alcalinos se han generado mediante ionización

por electronebulización (ESI-FR-ICR) a partir de disoluciones del polímero y los cloruros alcalinos (1mM) en mezclas de agua/metanol. Los análisis espectroscópicos IRMPD se han realizado tal y como se describe en el capítulo introductorio de este bloque.

### Cálculos químico cuánticos.

Las estructuras iniciales de los sistemas moleculares estudiados se han generado mediante “simulated annealing”. Para ello se ha empleado el código GULP [27] con el campo de fuerza UFF [28]. Para optimizar las estructuras se han realizado 20 ciclos de optimización (entre 300 y 500 K) con pasos en los estudios de dinámica molecular de 100 ps (dando como resultado un tiempo de cálculo por sistema de 2 ns). Posteriormente se llevó a cabo una selección de las estructuras más estables que se reoptimizaron mediante DFT. También se optimizaron estructuras creadas usando la intuición química y estudios previos [9, 21].

Se realizó una primera optimización molecular con un nivel de teoría 6-31+G\* para modelar los átomos de C, O e H. Las estructuras resultantes se optimizaron nuevamente empleando una base de cálculo superior, 6-31++G\*\*. Los errores de superposición de bases se han tenido en cuenta aplicando el método *counterpoise* [29]. Todas las energías se han corregido incluyendo en las energías electrónicas los valores de la vibración de punto cero y otras correcciones térmicas. Los espectros de infrarrojo se han generado mediante la convolución de las frecuencias de vibración armónicas del cálculo B3LYP/6-31++G\*\* con un ensanchamiento gaussiano de 8 cm<sup>-1</sup>. Las frecuencias teóricas se han redimensionado aplicando un factor de 0.98 en el caso de los complejos del 15c5 y de 0.97 para los complejos del PEG4 y el PEG9. Estos factores se han utilizado para corregir la posición de la banda del CO y hacerla coincidir con la del espectro IRMPD, y son consistentes con los valores del NIST [30, 31]

## 9.3. Discusión de resultados

Esta sección se divide en dos partes. La primera aborda la caracterización de los complejos binarios

15c5-M<sup>+</sup> (M= K, Rb, Cs) y su comparación con los complejos formados por éteres lineales y cationes alcalinos. La segunda se centra en la descripción del complejo ternario 15c5-K<sup>+</sup>-15c5, y en su comparación con los resultados del complejo binario 15c5-K<sup>+</sup>.

### 9.3.1. Complejos binarios 15c5-M<sup>+</sup> (M= K, Rb, Cs)

La figura 9.2 muestra los espectros IRMPD de los complejos 15c5-M<sup>+</sup> (M= K, Rb, Cs), PEG4-K<sup>+</sup> y PEG9-K<sup>+</sup> obtenidos experimentalmente, así como las frecuencias de vibración armónicas que predice el cálculo B3LYP/6-31++G\*\*, y los espectros IR teóricos correspondientes.

El intervalo espectral que hemos considerado en esta investigación, 800-1500 cm<sup>-1</sup>, comprende el análisis de las transiciones de la estructura del poliéter relacionadas con las tensiones C-O y C-C, junto con las flexiones C-O-C y C-C-O, la torsión de los ángulos dihedro y la torsión y la flexión simétrica fuera del plano de los enlaces C-H de los grupos etileno [23]. En el caso de los polímeros lineales PEG4 y PEG9 también se han considerado la flexión y la torsión de los grupos C-O-H terminales. En la tabla 9.1 se indica la asignación cualitativa de las principales bandas vibracionales observadas en los espectros, describiéndose en cada caso los modos vibracionales en términos del tipo de movimiento dominante, y los movimientos atómicos secundarios acoplados.

En la figura 9.2 podemos observar como los espectros IRMPD de los complejos 15c5 con los tres cationes considerados, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, son muy similares tanto en la posición de las bandas vibracionales como en la intensidad de las mismas. Este hecho sugiere que la conformación del éter-corona es aproximadamente la misma en los tres complejos. Esta consideración que es respaldada por los cálculos B3LYP. De hecho, los espectros IR teóricos reproducen de forma excelente los espectros IRMPD del experimento.

La estructura de equilibrio B3LYP de menor energía para el conformero 15c5-K<sup>+</sup> puede observarse en la figura 9.1. Las estructuras de los confór-

Tabla 9.1: **Asignación de los modos vibracionales correspondientes a las principales bandas observadas en los espectros IRPMD de los complejos 15c5-M<sup>+</sup> y PEG-K<sup>+</sup>.** El tipo de vibración dominante (en negrita) y los movimientos atómicos secundarios están indicados en cada caso. Las bandas se denotan por letras de la A a la H ordenadas de mayor a menor intensidad en el espectro IRMPD (ver figura 9.2).

| Banda  | Intervalo (cm <sup>-1</sup> ) | Modo vibracional   |
|--------|-------------------------------|--|
| G      | 800–850                       | <b>torsión CH<sub>2</sub></b> ; COC bending                                    |
| B      | 895–935                       | <b>estiramiento C–C</b> ; rocking del CH <sub>2</sub> , flexión COC            |
| E      | 1015–1030                     | <b>estiramiento C–C</b> ; estiramiento C–O                                     |
| A      | 1050–1135                     | <b>estiramiento C–O</b> ; torsiones OCCO, estiramiento C–C , flexión COH (PEG) |
| H      | 1200–1220<br>(sólo PEG)       | <b>flexión de COH terminal</b> ;<br>rocking del CH <sub>2</sub>                |
| D1, D2 | 1225–1310                     | <b>torsiones CH<sub>2</sub></b> ; estiramiento C–O, flexión COC                |
| C      | 1340–1360                     | <b>wagging del CH<sub>2</sub></b>  |
| F      | 1440–1500                     | <b>flexión del CH<sub>2</sub></b>  |

meros 15c5-Rb<sup>+</sup> y 15c5-Cs<sup>+</sup> no se muestran porque son prácticamente idénticas a la del 15c5-K<sup>+</sup>. No obstante, los parámetros geométricos relevantes para los complejos formados con los tres cationes y el 15c5 en estado libre, se detallan en la tabla 9.2.

Los tres confórmeros piramidales 15c5-M<sup>+</sup> presentan orientaciones asimétricas de los oxígenos del éter cíclico, estando cuatro de ellos orientados hacia el catión, y el quinto apuntando hacia el lado contrario del anillo. Uno de los cuatro oxígenos orientados hacia el catión —destacado con un círculo relleno en la figura 9.1— se localiza a una distancia del mismo especialmente corta. En cualquier caso, la diferencia entre la distancia O–M<sup>+</sup> menor y mayor es relativamente pequeña, aunque aumenta desde los 0.05 Å para el K<sup>+</sup> hasta los 0.13 para el Cs<sup>+</sup>.

Merece la pena destacar que la mayor distancia O–M<sup>+</sup> en cada caso es inferior a la suma del radio de van der Waals del oxígeno ( $\approx 1.5$  Å) y el radio iónico del catión alcalino ( $\approx 1.35, 1.5$  y  $1.7$  Å para el K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, respectivamente). Una coordinación oxígeno-metal tan estrecha implica también distancias cortas en los enlaces O–O de la estructura del 15c5 (sensiblemente más cortas que el doble del radio de van der Waals del oxígeno). La presencia del catión no permite el solapamiento entre los pares solitarios de los oxígenos del éter-corona, favoreciendo la existencia de atracciones O–M<sup>+</sup> que estabilizan la estructura piramidal distorsionada del 15c5 de un modo más

eficiente.

El tamaño de la cavidad del éter-corona se ensancha ligeramente desde el complejo 15c5-K<sup>+</sup> hasta el 15c5-Cs<sup>+</sup>, mientras que la distancia entre el catión y el centro de masas del éter aumenta según lo hace la diferencia en el radio catiónico (esto es, aumenta alrededor de 0.4 Å para el Cs<sup>+</sup> frente al K<sup>+</sup>).

La diferencia más apreciable entre los espectros IRMPD obtenidos experimentalmente para los tres complejos 15c5-M<sup>+</sup> radica en la envolvente de la banda intensa correspondiente al estiramiento del C–O (1000-1200 cm<sup>-1</sup>). La figura 9.2 muestra que mientras que la banda CO del complejo 15c5-K<sup>+</sup> es prácticamente simétrica, la intensidad relativa de las transiciones vibracionales de menor frecuencia que constituyen la banda, decrece al aumentar el tamaño del catión. El cálculo B3LYP reproduce fielmente esta tendencia, lo que indica que dicha pauta puede atribuirse principalmente a cambios en la absorción de un grupo de modos vibracionales localizado entre 1075 y 1100 cm<sup>-1</sup>, en relación con la de otro grupo de modos en el intervalo 1110-1140 cm<sup>-1</sup> (ver histogramas de la figura 9.2).

La inspección de las componentes vibracionales más intensas en cada uno de los grupos, a 1085 cm<sup>-1</sup>, y a 1110 cm<sup>-1</sup> y 1117 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, revela que el modo de baja frecuencia está dominado por la acción conjunta del estiramiento asimétrico de dos de los grupos C–O–C orienta-

Tabla 9.2: **Parámetros geométricos principales de los conformeros 15c5-Cs,Rb,K<sup>+</sup>, PEG4-K<sup>+</sup> y PEG9-K<sup>+</sup> más estables que predice el cálculo B3LYP/6-31++G<sup>\*\*</sup>.** Las distancias están Angstrom, los ángulos en grados. El primer valor de todas las entradas corresponde al oxígeno indicado con un círculo en la figura 9.1 (y se continúa la descripción en sentido horario en el caso del 15c5).

| Conf.                | distancias<br>O-M  | distancias<br>O-O   | ángulos<br>C-O-C   | ángulos dihedro<br>O-C-C-O                                       |
|----------------------|--|---|--|--|
| 15c5-Cs <sup>+</sup> | 3.099, 3.196, 3.122,<br>3.234, 3.148                                       | 2.919, 2.909, 2.809,<br>2.841, 2.919                                | 115.3, 113.0, 114.9,<br>115.2, 114.5                         | -62.1, 62.1, 62.7,<br>-65.5, -65.4                               |
| 15c5-Rb <sup>+</sup> | 2.917, 2.980, 2.940,<br>3.008, 2.960                                       | 2.901, 2.897, 2.801,<br>2.827, 2.908                                | 115.4, 113.2, 114.9,<br>115.3, 114.6                         | -61.1, 61.4, 62.2,<br>-64.6, -64.7                               |
| 15c5-K <sup>+</sup>  | 2.756, 2.793, 2.780,<br>2.809, 2.792                                       | 2.878, 2.878, 2.790,<br>2.810, 2.891                                | 115.6, 113.6, 114.9,<br>115.5, 114.8                         | -59.9, 60.6, 61.5,<br>-63.6, -63.8                               |
| PEG4-K <sup>+</sup>  | 2.779, 2.810, 2.812,<br>2.799, 2.800                                       | 2.823, 2.834, 2.834,<br>2.853, 4.896                                | 113.4, 113.3, 115.2  | 61.7, -63.4, 64.3,<br>57.9                                       |
| PEG9-K <sup>+</sup>  | 2.829, 2.938, 2.949, 2.998,<br>2.876, 2.975, 2.970, 2.975,<br>4.291, 5.170 | 2.882, 2.816, 2.889,<br>2.829, 2.864, 2.817,<br>2.852, 2.886, 2.841 | 114.3, 114.5, 113.1,<br>115.5, 113.5, 115.1,<br>115.2, 113.2 | 63.6, -63.0, -61.7,<br>64.2, 58.0, -63.3,<br>-56.8, -56.1, -64.1 |

dos hacia el catión (los dos grupos separados por el único grupo C-O-C que no apunta hacia el catión), y el *rocking* (flexión asimétrica en el plano) de los grupos CH<sub>2</sub> vecinos. En el par de modos dominantes de alta frecuencia, todos los grupos C-O-C muestran una actividad similar. Los cálculos indican que la fuerza relativa de las transiciones de estos últimos modos vibracionales más simétricos, aumenta con el tamaño del catión, modulando el momento dipolar del complejo de forma más eficiente.

Debemos señalar que el conformero 15c5-K<sup>+</sup> descrito en este capítulo, difiere del encontrado en un estudio previo de nuestro grupo [16], en el que se empleó un nivel de teoría inferior tanto en la búsqueda conformacional como en el proceso de optimización. La energía libre del conformero descrito en esta investigación (calculada con un nivel de teoría B3LYP/6-31G\*) es unos 6 KJ mol<sup>-1</sup> más baja que la obtenida en nuestra investigación previa [16] y mejora la concordancia con el espectro IRMPD obtenido experimentalmente, en concreto en relación a la descripción de la forma de la banda del CO. No obstante, en esta investigación más minuciosa no se ha encontrado ningún otro conformero de menor energía que el propuesto en la referencia [16].

Procederemos a continuación a comparar los resultados del estudio de los complejos 15c5-M<sup>+</sup>

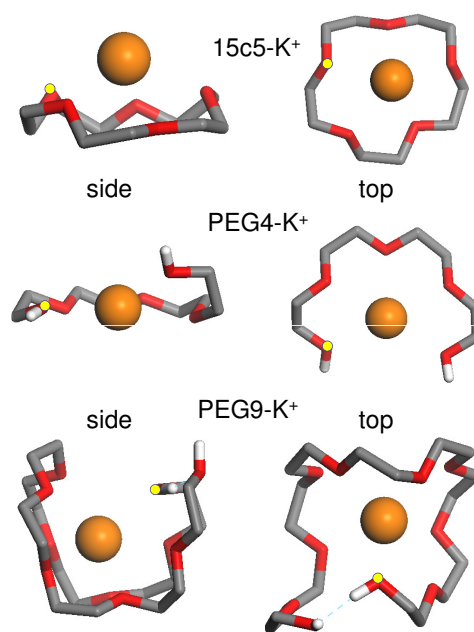


Figura 9.1: **Representación de los conformeros de menor energía según el cálculo B3LYP/6-31++G<sup>\*\*</sup> para los complejos 15c5-K<sup>+</sup>, PEG4-K<sup>+</sup> y PEG9-K<sup>+</sup>.** Los complejos del 15c5-Cs<sup>+</sup> y 15c5-Rb<sup>+</sup> (no mostrados) son muy similares al del 15c5-K<sup>+</sup>. La tabla 9.2 muestra los parámetros estructurales más significativos para la descripción estructural de los complejos, tales como distancias y ángulos de enlace, empezando con el oxígeno que se denota en los gráficos con un pequeño círculo amarillo superpuesto en las estructuras.

con los obtenidos previamente por nuestro grupo a partir del análisis de los complejos formados por polímeros lineales y cationes alcalinos de diferente longitud de cadena [25,26]. En concreto, utilizaremos los resultados del análisis conformacional de los complejos PEG4-K<sup>+</sup> y PEG9-K<sup>+</sup>.

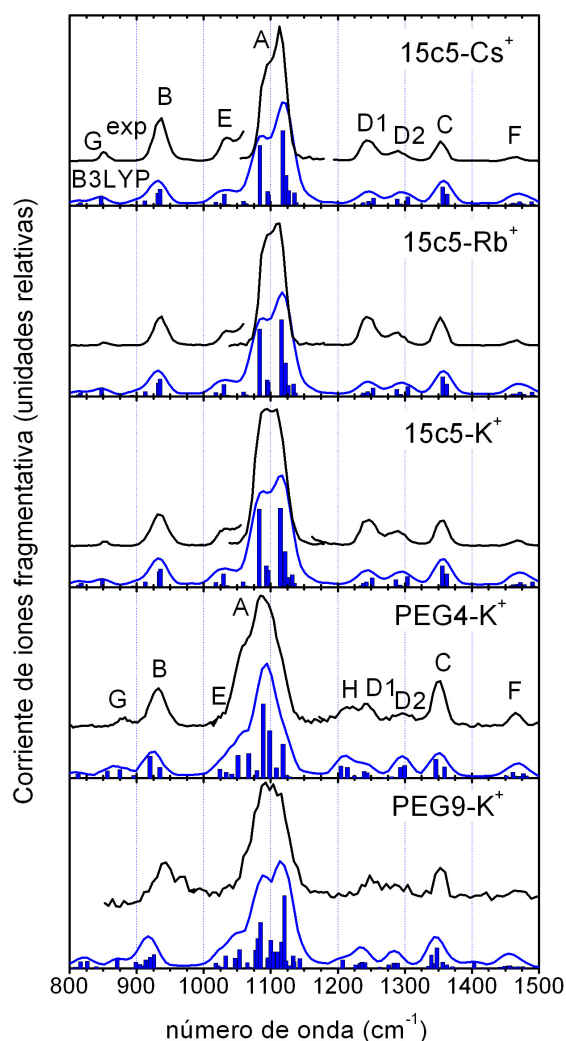


Figura 9.2: Espectros IR de los complejos 15c5-Cs<sup>+</sup>, 15c5-Rb<sup>+</sup>, 15c5-K<sup>+</sup>, PEG4-K<sup>+</sup> y PEG9-K<sup>+</sup> medidos experimentalmente (IRMPD) y calculados de forma teórica (B3LYP/6-31++G\*\*). La curva superior de cada panel representa los espectros IRMPD. La tabla 9.1 muestra la asignación cualitativa de las bandas vibracionales denotadas en los espectros con letras de la A a la H. Las transiciones armónicas (barras verticales) que predice el cálculo B3LYP/6-31++G\*\* se muestran en cada panel junto con el espectro IR teórico resultante de incluir un ensanchamiento de las líneas de 8 cm<sup>-1</sup> (curva inferior en cada panel). Los complejos asociados con tales espectros están representados en la figura 9.1.

En el caso del complejo PEG4-K<sup>+</sup> los cinco oxígenos de la estructura lineal del esqueleto del poliéter poseen una libertad conformacional significativamente mayor que la del 15c5 para desarrollar una red de coordinación óptima alrededor del catión. De hecho, los espectros IRMPD de los complejos PEG4-K<sup>+</sup> varían significativamente con respecto al obtenido para el complejo 15c5-K<sup>+</sup>, tal y como puede verse en la figura 9.2. En concreto la banda asociada a la vibración del CO se desplaza y se ensancha de forma notable hacia frecuencias más bajas. Además, el espectro experimental del PEG4-K<sup>+</sup> muestra una banda a 1200-1220 cm<sup>-1</sup> que no está en el espectro IRMPD del complejo del éter-corona 15c5. El cálculo B3LYP reproduce estos aspectos de forma precisa, salvo por las componentes que afectan a la forma de la envolvente de la banda del CO, en el intervalo espectral localizado en 1000-1150 cm<sup>-1</sup>, e identifica la banda situada en 1200-1220 cm<sup>-1</sup> como la suma de dos modos de flexión del C-O-H muy próximos, cada uno de los cuales se asocia a un grupo terminal del polímero. El cálculo B3LYP atribuye todas estas características espectrales a un único conformero, que sería el que contribuiría de forma preferente al experimento, ya que el resto de conformaciones superan al menos en 7,5 kJ mol<sup>-1</sup> la energía del conformero más estable.

La figura 9.1 y la tabla 9.2 muestran como la cadena del PEG4 adopta una disposición semicircular para formar el complejo de inclusión del catión K<sup>+</sup>. Esta estructura, prácticamente plana, recuerda al conformero más estable de simetría D<sub>3d</sub> propuesto para el complejo 18c6-K<sup>+</sup> [3,19]. Sin embargo, en el complejo PEG4-K<sup>+</sup> uno de los grupos -CH<sub>2</sub>-OH terminales se desplaza hacia fuera del plano para conseguir una coordinación óptima similar del oxígeno con el catión, a la vez que evita la repulsión con el oxígeno del otro grupo terminal del polímero.

El estudio del complejo PEG9-K<sup>+</sup> explora la evolución de las conformaciones del polímero conforme aumenta la longitud de la cadena. El esqueleto molecular del PEG9-K<sup>+</sup> es capaz de “abrazar” al catión de forma eficiente a la vez que permite las interacciones de tipo puente de hidrógeno entre los grupos OH terminales. La figura 9.3 muestra el conformero más estable del complejo PEG9-K<sup>+</sup> que predice la teoría. Nuestro estudio lleva a la

conclusión de que la formación del complejo PEG9- $K^+$  tiene lugar principalmente a través de disposiciones del éter en estructuras de tipo “jaula”, con un puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo terminales, y un número de coordinación O- $K^+$  de ocho. Aquí, la coordinación se refiere arbitrariamente a las distancias O- $K^+$  inferiores al 25 % de la suma del radio de van der Waals del oxígeno y el radio iónico del  $K^+$  (esto es, distancias O- $K^+$  menores que 3.5 Å). La tabla 9.2 muestra que al menos dos oxígenos de un extremo de la cadena están desplazados a distancias mayores de 4 Å del catión.

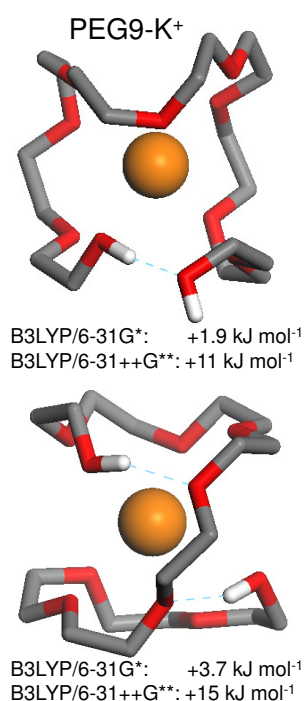


Figura 9.3: Representación de dos conformeros en estado excitado según el cálculo B3LYP del complejo PEG9- $K^+$ . Junto a cada figura se muestra la diferencia relativa de energía libre con el conformero de menor energía (ver figura 9.1) calculada con los dos niveles de teoría empleados en el estudio.

El espectro IRMPD registrado para el complejo PEG9- $K^+$  es consistente con la contribución dominante de este conformero (ver figura 9.2). La evidencia de la existencia de puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales se apoya en la disminución de la intensidad de la banda situada en

1200-1220 cm<sup>-1</sup>, asociada a la flexión del C-O-H en el espectro IRMPD del PEG9- $K^+$ , en comparación con el espectro del complejo PEG4- $K^+$ . Por otro lado, también puede observarse como la banda asociada al estiramiento del C-C, situada en torno a 920-980 cm<sup>-1</sup>, se desplaza hacia el rojo en unos 20 cm<sup>-1</sup> en el cálculo B3LYP. Este efecto puede relacionarse con el requerimiento de factores de escala distintos para los modos de vibración del C-C y el C-O, al igual que se propone en estudios de espectroscopia vibracional de sistemas moleculares de tamaño y flexibilidad similares [32, 33].

Al realizar la búsqueda teórica de las posibles estructuras conformacionales del complejo PEG9- $K^+$  se llevó a cabo un proceso de “simulated annealing” especialmente largo, ya que esperábamos encontrar un buen número de conformeros cercanos en energía debido a la gran flexibilidad de la cadena del poliéter. Sin embargo, todas las alternativas conformacionales optimizadas mediante B3LYP/6-31++G\*\* que se encontraron poseían valores de energía libre que superaban la del conformero del nivel fundamental en más de 10 kJ mol<sup>-1</sup> —lo que equivale a más de cuatro veces la energía térmica  $K_B T$  a temperatura ambiente—.

Los dos primeros conformeros en estado excitado del complejo PEG9- $K^+$  que predice el cálculo B3LYP están representados en la figura 9.3. Ambos conformeros muestran características estructurales relevantes que ponen de manifiesto que el aumento en el número de oxígenos coordinados con el catión no constituye necesariamente una ruta eficiente para estabilizar el complejo.

En el primer conformero excitado del complejo PEG9- $K^+$  (+11 kJ mol<sup>-1</sup>) se alcanza una coordinación del catión con nueve oxígenos y en el segundo (+15 kJ mol<sup>-1</sup>) con diez oxígenos, en comparación con los ocho del conformero más estable. La ventaja de la coordinación con sólo ocho oxígenos es doble: (i) da lugar a una interacción oxígeno-catión más cercana y (ii) plantea menos restricciones al esqueleto del polímero y a la orientación de los puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales. En este sentido, se podría inferir que si los puentes de hidrógeno se suprimiesen, las estructuras de mayor coordinación con el catión podrían adquirir mayor relevancia. Este sería el caso para el polietilen glicol metil éter análogo, en el cual



los grupos hidroxilo terminales están reemplazados por grupos metoxi ( $\text{O}-\text{CH}_3$ ).

### 9.3.2. Complejos ternarios $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$

La formación de complejos piramidales entre macrociclos y cationes abre la posibilidad a la formación de complejos ternarios en los que un segundo ciclo se une al catión. Presentamos aquí los resultados obtenidos para el complejo ternario  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$ , combinando espectroscopía IRMPD y cálculos conformacionales con un nivel de teoría B3LYP/6-31+G\*.

La figura 9.4 muestra el espectro ESI-FTICR IRMPD registrado para el complejo  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$  en la región del espectro comprendida entre 800 y  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Se incluye el espectro IRMPD del complejo  $15\text{c}5-\text{K}^+$  para facilitar la comparación entre ambos sistemas.

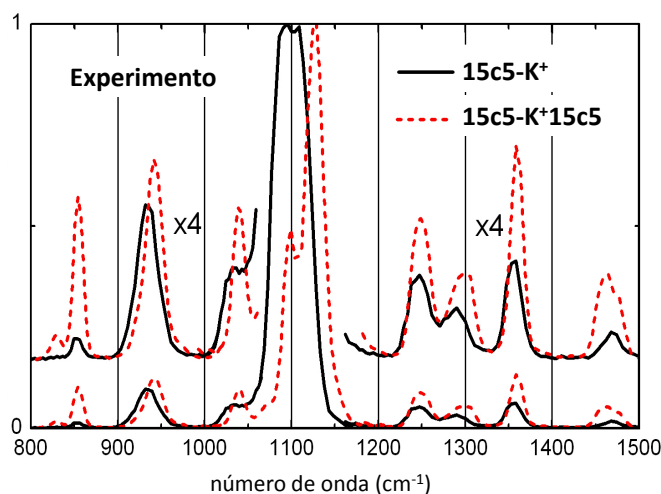


Figura 9.4: Espectros IRMPD de los complejos  $15\text{c}5-\text{K}^+$  (línea sólida) y  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$  (línea punteada). Cada espectro se ha normalizado de forma independiente, dando el valor de 1 a la intensidad máxima de la corriente fragmentativa de iones detectada. Las bandas más intensas situadas a  $935$ ,  $1000$ - $1220$  y  $1360\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas principalmente con los estiramientos C-C y C-O y la torsión del  $\text{CH}_2$ , respectivamente.

Tal y como se mencionó anteriormente en esta zona espectral la absorción óptica está relacionada

básicamente con las tensiones C-O y C-C, combinados con la flexión y la torsión de los ángulos dihedro de los enlaces C-O-C y C-C-O y de los grupos  $\text{CH}_2$  con respecto al esqueleto cíclico del políeter [34]. La banda localizada en  $1000$ - $1200\text{ cm}^{-1}$ , asociada esencialmente con los estiramientos del C-O, domina la corriente de fragmentación en los espectros IRMPD y se espera que sea sensible a las variaciones en la coordinación oxígeno-catión.

Se observan diferencias significativas en los espectros IRMPD de los complejos binario y ternario, en particular en la estructura y posición de la banda asociada a las tensiones C-O. La figura 9.5 compara los dos espectros de infrarrojo registrados experimentalmente con los obtenidos a partir de los cálculos teóricos de tipo DFT-B3LYP/6-31+G\*, en el intervalo  $1000$ - $1200\text{ cm}^{-1}$ . El espectro teórico calculado para el éter-corona libre también se muestra como referencia. Puede observarse que los cálculos DFT predicen desplazamientos de la banda vibracional asociada al C-O para los complejos  $15\text{c}5-\text{K}^+$  y  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$  de  $35$  y  $20\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, con respecto al éter  $15\text{c}5$  libre, lo cual coincide con los desplazamientos de la banda del C-O que se observan experimentalmente. El mayor desplazamiento que experimenta dicha banda en el caso del  $15\text{c}5-\text{K}^+$  se relaciona con interacciones oxígeno-catión más intensas que en el caso del complejo ternario.

Puede observarse que los espectros teóricos de los complejos muestran dos picos principales bien resueltos a  $1089$  y  $1115\text{ cm}^{-1}$  para el  $15\text{c}5-\text{K}^+$ , y a  $1098$  y  $1127\text{ cm}^{-1}$  para el  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$ . Si bien estos dos mismos picos aparecen en los espectros medidos experimentalmente, sólo están resueltos en el caso del complejo ternario  $15\text{c}5-\text{K}^+-15\text{c}5$ .

En el complejo  $15\text{c}5-\text{K}^+$  las intensidades de los dos picos son similares, y ambos casi se fusionan y se diluyen en la zona superior, prácticamente plana, de la banda. De hecho, la mayor intensidad detectada experimentalmente de la banda localizada en  $1089\text{ cm}^{-1}$  en el complejo binario, en comparación con la situada en  $1098\text{ cm}^{-1}$  del complejo ternario, la predice relativamente bien a nivel cualitativo el cálculo DFT y puede explicarse por el cambio más pronunciado en el momento dipolar implicado en los modos vibracionales correspondientes. Estos modos implican de forma predomi-

Tabla 9.3: **Parámetros estructurales del 15c5 libre y el complejo ternario 15c5–K<sup>+</sup>–15c5, resultantes del cálculo teórico DFT/B3LYP/6–31G\*.** Los parámetros recogidos en la tabla son representativos de la organización espacial de los oxígenos del éter–corona al coordinarse con el catión. Notación: *d*: distancia;  $\alpha$ : ángulo; c.o.m.: centro de masas del éter–corona; c.o.m.(O): centro de masas de los cinco oxígenos del mismo éter–corona 15c5; *E*: energía de enlace de un ligando ;  $\mu$ : momento dipolar (el asterisco indica el momento dipolar parcial del éter–corona, excluyendo el resto del complejo).

| Param. Estructurales                               | 15c5                | 15c5–K <sup>+</sup> –15c5 (1) | 15c5–K <sup>+</sup> –15c5 (2) |
|--|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| $d(\text{K}^+ - \text{O})$ /pm                     | –                   | 297,299,285,299,318           | 295,314,297,285,300           |
| $d(\text{O}_n - \text{O}_{n+1})$ /pm               | 294,293,296,300,297 | 278,290,282,279,275           | 275,279,281,290,278           |
| $\alpha(\text{O}_{n-1} \text{O}_n \text{O}_{n+1})$ | 117,73,158,73,117   | 122,94,104,120,88             | 122,88,120,104,94             |
| $d(\text{K}^+ - \text{c.o.m.})$ /pm                | –                   | 210                           | 208                           |
| $d(\text{K}^+ - \text{c.o.m.}(\text{O}))$ /pm      | –                   | 185                           | 183                           |
| $d(\text{c.o.m.} - \text{c.o.m.}(\text{O}))$ /pm   | 12                  | 25                            | 25                            |
| $E$ /(kJ mol <sup>–1</sup> )                       | 0                   | 147                           | 147                           |
| $\mu$ /D   | 1.69                | 0.38/2.74*                    | 0.38/2.74*                    |

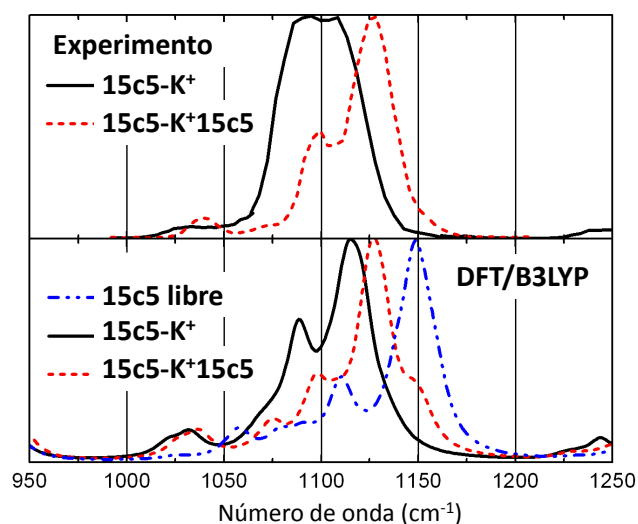


Figura 9.5: Panel superior: detalle de la banda asociada a la vibración del C–O en los espectros IRMPD de los complejos 15c5–K<sup>+</sup> (línea sólida) y 15c5–K<sup>+</sup>–15c5 (línea punteada). Panel inferior: detalle de la banda asociada a la vibración del C–O calculada mediante DFT–B3LYP/6–31G\* para los complejos binario y ternario y el éter–corona libre. Los espectros teóricos se han construido combinando las transiciones vibracionales que predice el cálculo con la anchura del láser (8 cm<sup>–1</sup>). Todos los espectros se han normalizado asignando a la máxima intensidad el valor de 1. El espectro DFT–B3LYP del complejo binario 15c5–K<sup>+</sup> que se muestra no corresponde con la estructura de menor energía, sino a un conformero ligeramente excitado. El espectro teórico del complejo binario correspondiente a la estructura del complejo de mínima energía puede verse en la figura 9.2

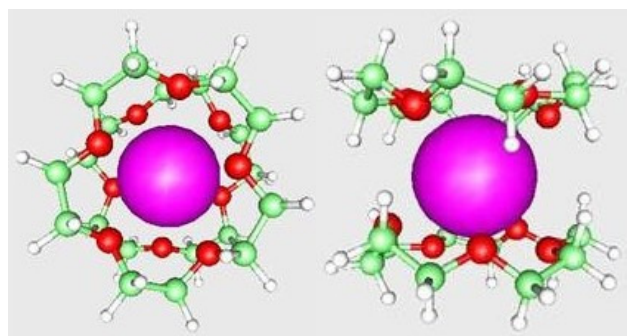


Figura 9.6: Representación gráfica de la estructura geométrica de equilibrio que predice el cálculo DFT–B3LYP/6–31G\* para el complejo ternario 15c5–K<sup>+</sup>–15c5.

Ver la tabla 9.3 para consultar los valores de algunos parámetros estructurales relevantes.

nante la vibración de uno solo de los oxígenos de la cadena, el cual experimenta un estiramiento simétrico C–O–C y estiramientos asimétricos O–C–C. En el complejo ternario, la misma vibración ocurre en cada uno de los éteres corona, pero los oxígenos implicados están situados en el lado opuesto uno con respecto al otro, dando lugar a una vibración coordinada con un menor cambio global en el momento dipolar.



La buena correlación que existe entre los resultados teóricos y experimentales permite asociar estas diferencias espectrales con cambios estructurales relacionados con la coordinación de los oxígenos del éter y el catión alcalino. La figura 9.3.2 muestra la conformación del complejo ternario simulado teóricamente. Mientras que el complejo 15c5-K<sup>+</sup> adopta una estructura piramidal, en la que el catión se sitúa sobre el centro de masas de la cavidad del poliéter (a una distancia similar a su radio iónico), el complejo ternario 15c5-K<sup>+</sup>-15c5 muestra una coordinación menos ajustada del catión con los dos ciclos, adoptando una estructura tipo *sandwich* en la que las cadenas del éter están enfrentadas y rotadas entre sí  $2\pi/10$  para minimizar las repulsiones intermoleculares entre los oxígenos que las componen.

## 9.4. Conclusiones

En esta investigación se ha llevado a cabo un estudio de espectroscopía infrarroja combinada con cálculos B3LYP para caracterizar los complejos formados por el éter-corona 15c5 y cationes alcalinos en fase gaseosa. Los resultados del estudio se han comparado con los de análisis espectroscópicos similares y de desorción/ionización láser realizados por nuestro grupo con anterioridad para los complejos formados por polímeros lineales.

Los espectros registrados experimentalmente de los complejos 15c5-M<sup>+</sup> (M = K, Rb, Cs) se corresponden con estructuras piramidales del esqueleto del éter-corona de carácter asimétrico, en las cuales el catión se coloca sobre el anillo. Esto se debe al mayor tamaño de los cationes (mayor radio iónico) en comparación con el tamaño de la cavidad del éter. El polímero en estos casos minimiza la energía libre de la estructura, orientando cuatro de los oxígenos de la cavidad hacia el catión que se dispone por encima del anillo, y colocando el quinto oxígeno hacia la cara opuesta del mismo. Esta estructura da lugar a la pequeñas diferencias entre las distancias oxígeno-catión de los distintos complejos 15c5-M<sup>+</sup> estudiados.

La comparación de nuestros resultados con los de estudios análogos realizados con complejos PEG4 y PEG9 con K<sup>+</sup> apoya la afirmación de que la fle-

xibilidad de la cadena del polímero es un factor fundamental en la disposición estructural de los complejos polímero-catión. En el caso del complejo PEG4-K<sup>+</sup> se forma un complejo de inclusión en el que el polímero se pliega en torno al catión, adoptando una disposición prácticamente plana en la que cuatro oxígenos rodean al catión y tan sólo un oxígeno terminal se orienta hacia fuera del plano. Esta estructura recuerda a la que exhibe el complejo de inclusión formado por el 18c6-K<sup>+</sup>, de tipo D<sub>3d</sub>, y que es responsable de la selectividad del éter-corona 18c6 por el K<sup>+</sup> en fases condensadas. En el caso del complejo PEG9-K<sup>+</sup>, en el que un máximo de 10 oxígenos pueden coordinar con el catión, el confórmero de menor energía corresponde a estructuras de tipo “jaula”, en las que 8 oxígenos coordinan con el catión a la vez que se establecen puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales. El cálculo B3LYP predice que el aumento del número de coordinación supone un incremento de la energía del complejo, a causa del aumento de las distancias oxígeno-catión asociadas a los efectos estéricos de las repulsiones oxígeno-oxígeno que implica este número de coordinación. La coordinación de 10 oxígenos que muestran confórmeros con estructura helicoidal del polímero en torno al catión, en la que se establecen puentes de hidrógeno entre los grupos OH terminales y los oxígenos del esqueleto del poliéter, son aún más energéticas.

Del análisis conformacional comparativo de los complejos binario (15c5-K<sup>+</sup>) y ternario (15c5-K<sup>+</sup>-15c5) del 15c5 con el catión K<sup>+</sup> pueden extraerse varias conclusiones.

En primer lugar, la coordinación oxígeno-catión es más estrecha en el caso del complejo binario que en el ternario, siendo las interacciones atractivas más fuertes en el primer caso. Como consecuencia, la banda asociada al C-O en el complejo ternario aparece desplazada en los espectros hacia números de onda más bajos.

En segundo lugar, la exposición del catión en el complejo binario, que se sitúa por encima del ciclo, permite la formación del complejo ternario de forma eficiente. En este caso, la interacción con el catión es más débil, pero la estructura de los dos éteres-corona que forman parte del complejo continúa experimentando una distorsión significativa.

Por último, el complejo ternario adopta una configuración de tipo *sandwich* en la que los dos éteres-corona minimizan las interacciones repulsivas entre los pares solitarios de los oxígenos de sus respectivos esqueletos moleculares, mediante la rotación de los mismos, uno con respecto a otro, quedando los oxígenos de uno y otro lado intercalados.

Este tipo de sistemas ternarios podrían tenerse en cuenta en el diseño de pinzas moleculares basadas en éteres-corona, los cuales son sistemas lo suficientemente flexibles como para adoptar estructuras de equilibrio mediante la rotación relativa de las cavidades, y albergar potencialmente a distintos ligandos.

---

## Bibliografía

---

- [1] C.J. Pedersen. *The discovery of Crown Ethers*. Science 241 (4865): 536–540 (1988)
- [2] G.W. Gokel. *Crown Ethers and Cryptands*. Royal Society of Chemistry, 1994, ISBN-13: 978-0851867045.
- [3] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, S. Hamad, J. Steill and J. Oomens. *Emergence of Symmetry and Chirality in Crown Ether Complexes with Alkali Metal Cations*. The Journal of Physical Chemistry A 114 (26): 7048–7054 (2010)
- [4] S. Maleknia, J. Brodbelt. *Gas-phase selectivities of crown ethers for alkali metal ion complexation*. Journal of The American Chemical Society 114 (11): 4295-4298 (1992)
- [5] S.M. Blair, E.C. Kempen, J. Brodbelt. *Determination of binding selectivities in host-guest complexation by electrospray/quadrupole ion trap mass spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry 9 (10): 1049-1059 (1998).
- [6] I.H. Chu, H. Zhang, D. Dearden. *Macrocyclic chemistry in the gas phase: intrinsic cation affinities and complexation rates for alkali metal cation complexes of crown ethers and glymes*. Journal of the American Chemical Society 115 (13): 5736-5744 (1993)
- [7] S. Lee, T. Wyttenbach, G. von Helden, M.T. Bowers. *Gas Phase Conformations of  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , and  $Cs^+$  Complexed with 18-Crown-6*. Journal of the American Chemical Society 117 (40): 10159–10160 (1995)
- [8] T. Wyttenbach, G. von Helden, M.T. Bowers. *Conformations of alkali ion cationized polyethers in the gas phase: polyethylene glycol and bis[(benzo-15-crown-5)-15-ylmethyl] pimelate*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 165/166: 377-390 (1997)
- [9] J. Gidden, T. Wyttenbach, A.T. Jackson, J.H. Scrivens, M.T. Bowers. *Gas-Phase Conformations of Synthetic Polymers: Poly(ethylene glycol), Poly(propylene glycol), and Poly(tetramethylene glycol)*. Journal of the American Chemical Society 122 (19): 4692–4699 (2000)
- [10] D.M. Peiris, Y. Yang, R. Ramanathan, K.R. Williams, C. Watson, J.R. Eyler. *Infrared multiphoton dissociation of electrosprayed crown ether complexes*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 157/158: 365-378 (1996)
- [11] M.B. More, D. Ray, P.B. Armentrout. *Intrinsic Affinities of Alkali Cations for 15-Crown-5 and 18-Crown-6: Bond Dissociation Energies of Gas-Phase  $M^+$ -Crown Ether Complexes*. Journal of The American Chemical Society 121 (2): 417-423 (1999)
- [12] P.B. Armentrout. *Cation–ether complexes in the gas phase: thermodynamic insight into molecular recognition*. International Journal of Mass Spectrometry 193 (2-3): 227-240 (1999)

- [13] J.B. Nicoll, D.V. Dearden. *Reactions of multidentate ligands with ligated alkali cation complexes: self-exchange and “sandwich” complex formation kinetics of gas phase crown ether–alkali cation complexes*. International Journal of Mass Spectrometry 204 (1-3): 171-183 (2001)
- [14] J.D. Anderson, E.S. Paulsen, D. Dearden. *Alkali metal binding energies of dibenzo-18-crown-6: experimental and computational results*. International Journal of Mass Spectrometry 227 (1): 63-76 (2003)
- [15] A.R. Hortal, P. Hurtado, B. Martínez-Haya, A. Arregui, L. Bañares. *Solvent-Free MALDI Investigation of the Cationization of Linear Polyethers with Alkali Metals*. The Journal of Physical Chemistry B 112 (29): 8530–8535 (2008)
- [16] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, J.D. Steill, J. Oomens, P.J. Merklings. *Spectroscopic Investigation of the Gas-Phase Conformations of 15-Crown-5 Ether Complexes with  $K^+$* . The Journal of Physical Chemistry A 113 (27): 7748-7752 (2009)
- [17] J.D. Rodriguez, D. Kim, P. Tarakeshbar, J.M. Lisy. *Exploring Gas-Phase Ion-Ionophore Interactions: Infrared Spectroscopy of Argon-Tagged Alkali Ion-Crown Ether Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A 114 (3): 1514-1520 (2010)
- [18] J.D. Rodriguez, T.D. Vaden, J.M. Lisy. *Infrared Spectroscopy of Ionophore-Model Systems: Hydrated Alkali Metal Ion 18-Crown-6 Ether Complexes*. Journal of The American Chemical Society 131(47): 17277-17285 (2009)
- [19] E.D. Glendening, D. Feller, M.A. Thompson. *An Ab Initio Investigation of the Structure and Alkali Metal Cation Selectivity of 18-Crown-6*. Journal of The American Chemical Society 116 (23) 10657-10669 (1994)
- [20] D. Feller. *Ab Initio Study of  $M^+$ :18-Crown-6 Microsolvation*. The Journal of Physical Chemistry A 101 (14): 2723-2731 (1997)
- [21] S.E. Hill, D. Feller. *Theoretical study of cation/ether complexes: 15-crown-5 and its alkali metal complexes*. International Journal of Mass Spectrometry 201 (1-3): 41-58 (2000)
- [22] H.S. Kim. *Selectivity of 18-Crown-6 between  $Cs^+$  and  $Rb^+$  Ion: Solvent Effect by a Monte Carlo Simulation Study*. The Journal of Physical Chemistry B 108 (31): 11753-11759 (2004)
- [23] S. Al-Rusaese, A.A. Al-Kahtani, A.A. El-Ahzhary. *Experimental and Theoretical Study of the Vibrational Spectra of 12-Crown-4-Alkali Metal Cation Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A 110 (28): 8676-8687 (2006)
- [24] M. Gajewski, J. Tuszyński, H. Mori, E. Miyoshi, M. Klobukowski. *DFT studies of the electronic structure and geometry of 18-crown-6, hexaaza[18]annulene, and their complexes with cations of the heavier alkali and alkaline earth metals*. Inorganica Chimica Acta 361 (7): 2166-2171 (2008)
- [25] P. Hurtado, A.R. Hortal, F. Gámez, S. Hamad, B. Martínez-Haya. *Gas phase complexes of cyclic and linear polyethers with alkali cations*. Physical Chemistry Chemical Physics 12 (2010) 13752-13758.
- [26] A.R. Hortal. *Puesta a punto y aplicación de técnicas láser y de espectrometría de masas para la caracterización de polímeros orgánicos y biológicos y sus agregados no covalentes*. Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales. Universidad Pablo de Olavide.
- [27] J.D. Gale, A.L. Rohl. *The General Utility Lattice Program (GULP)*. Molecular Simulation 29 (5): 291–341 (2003)
- [28] A.K. Rappe, C.J. Casewit, K.S. Colwell, W.A. Goddard III, W.M. Skiff. *UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations*. Journal of The American Chemical Society 114 (25): 10024–10035 (1992)

- [29] S.F. Boys, F. Bernardi. *The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors.* Molecular Physics 19 (4): 553-566 (1970)
- [30] NIST Standard Reference Database 101; Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase: <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>.
- [31] K.K. Irikura, R.D. Johnson II, R.N. Kacker. *Uncertainties in Scaling Factors for ab Initio Vibrational Frequencies.* The Journal of Physical Chemistry A 109 (37): 8430-8437 (2005)
- [32] J.R. Avilés Moreno, F. Partal Ureña, and J. López González. *Conformational preference of a chiral terpene: vibrational circular dichroism (VCD), infrared and Raman study of S-(-)-limonene oxide.* Physical Chemistry Chemical Physics 11 (14): 2459-2467 (2009)
- [33] F. Partal Ureña, J.R. Avilés Moreno, J. López González. *Conformational Flexibility in Terpenes: Vibrational Circular Dichroism (VCD), Infrared and Raman Study of S-(-)-Perillaldehyde.* The Journal of Physical Chemistry A 112 (34): 7887-7893 (2008)
- [34] S. Al-Rusaese, A.A. Al-Kahtani, A.A. El-Ahzhary. *Experimental and Theoretical Study of the Vibrational Spectra of 12-Crown-4-Alkali Metal Cation Complexes.* The Journal of Physical Chemistry A 110 (28): 8676-8687 (2006)



---

### Análisis estructural de complejos de éteres–corona con $\text{H}_3\text{O}^+$ y $\text{NH}_4^+$

---

Los complejos formados por los éteres–corona y los cationes hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) son fundamentales para la comprensión del comportamiento supramolecular de estos poliéteres en disolventes próticos. En este trabajo se han investigado los complejos formados por los poliéteres cíclicos 15–crown–5 (15c5) y 18–crown–6 (18c6) con dichos cationes y sus variantes deuteradas. En el estudio se emplea la espectroscopia vibracional de disociación multifotónica en el infrarrojo, combinada con cálculos teóricos a nivel DFT B3LYP/6-31++G(d,p), para realizar las asignaciones conformacionales. Los complejos del 18c6 presentan dos conformaciones próximas energéticamente de tipo  $C_{3v}$ , con enlaces  $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$  y  $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$  lineales. Los complejos del 15c5 adoptan geometrías piramidales asimétricas parcialmente plegadas, que dan lugar a un puente de hidrógeno lineal, más corto, y a dos puentes de hidrógeno no lineales de mayor longitud. En los complejos  $15\text{c}5-\text{H}_3\text{O}^+/\text{D}_3\text{O}^+$  se produce un ensanchamiento apreciable de las bandas vibracionales en el espectro IRMPD, que puede interpretarse como una evidencia de la compartición parcial del protón (o deuterón) entre el agua y el éter–corona. Se generaría un puente protónico a lo largo del enlace intermolecular de tipo lineal  $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ , que es especialmente corto en este caso.





## 10.1. Introducción

Los complejos supramoleculares formados por los éteres-corona con iones oxonio,  $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$  [1–6], el ion amonio,  $\text{NH}_4^+$  y [7–14] y las aminas protonadas,  $\text{RNH}_3^+$ ,  $\text{R}_2\text{NH}_2^+$  [15–21], constituyen actualmente áreas de investigación teórica y experimental bastante activas. Por ejemplo, los éteres-corona son conocidos por estabilizar iones oxonio de tamaños específicos [6], y mostrar una capacidad única para el reconocimiento y la discriminación enantiomérica de aminas y aminoácidos en disolventes próticos.

A pesar del rápido desarrollo de la química de los éteres-corona y de sus aplicaciones, todavía existen aspectos conformacionales básicos de sus complejos con hidronio y amonio que son objeto de debate. El éter 18-crown-6 (18c6) posee una cavidad con seis oxígenos que se ajusta bien con una coordinación  $C_{3v}$  con el  $\text{H}_3\text{O}^+$  y el  $\text{NH}_4^+$ . Tal coordinación puede suponer tanto puentes de hidrógeno lineales entre el huésped y tres oxígenos del éter o, de forma alternativa, la participación de todos los oxígenos del anillo en la interacción huésped-hospedador, mediante conformaciones “bifurcadas” [2–4, 9, 10]. Mientras que los estudios teóricos y experimentales apoyan las conformaciones con enlaces lineales [2, 3, 5, 14], la cuestión de la localización del protón no es trivial, y aspectos clave, tales como la formación de puentes protónicos, no se ha descrito de forma precisa en estos sistemas.

La mayoría de las investigaciones previas de los complejos formados por éteres-corona y los cationes  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  se han realizado en disolución o en fase sólida. En esos medios, las interacciones con el disolvente y con los contraiones, [2, 6] plantean serias dificultades para la modelización teórica *ab initio* de este tipo de sistemas.

Por otra parte, en la última década se ha llevado a cabo un buen número de estudios en estado gaseoso de complejos constituidos por éteres-corona y aminas protonadas y aminoácidos [15–19]. Dichos estudios se han centrado principalmente en la determinación de las afinidades relativas y la estequiometría de los complejos, más que en su estructura. Como excepción, a partir de experi-

mentos de movilidad iónica [18] se determinaron a grandes rasgos tendencias conformacionales generales, tales como que los complejos de los éteres-corona con aminoácidos protonados son más compactos que los análogos constituidos por poliéteres lineales.

### 10.1.1. Objetivos

El objetivo de esta investigación es la caracterización de los complejos formados en estado gaseoso por los éteres-corona 18-crown-6 y 15-crown-5 con el hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En el caso del 15-crown-5 también se han considerado huéspedes catiónicos deuterados. Para ello se ha utilizado, al igual que en el resto de experimentos presentados en este bloque, la espectroscopia infrarroja de disociación multifotónica (IRMPD) combinada con cálculos teóricos para la asignación conformacional.

Con este estudio se pretende profundizar en el análisis del abanico conformacional que adoptan los éteres-corona al interaccionar con cationes de diversa naturaleza química, dentro de una línea de trabajo de reciente implantación en nuestro grupo, [22–24] de la que han surgido varias publicaciones acerca del análisis estructural de los complejos de 15c5 y el 18c6 con cationes alcalinos, comentadas en detalle en capítulos anteriores. Pretendemos demostrar en este caso, que la posición y el ensanchamiento de las bandas vibracionales constituye una valiosa manifestación de la estructura geométrica subyacente de los complejos, en relación con cuestiones como la localización protónica y la formación de puentes de protones [25–32].

## 10.2. Metodología

### Análisis espectroscópicos.

Los complejos de los éteres-corona con hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) se han generado mediante ionización por electronebulización (ESI) de disoluciones ácidas del éter-corona (1mM) en una mezcla de agua/metanol. Para formar los complejos  $15\text{c}5\text{-D}_3\text{O}^+$  se empleó una disolución de  $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OD}$  con el áci-

do acético deuterado ( $\text{CH}_3\text{COOD}$ ). Para los complejos del éter-corona con el amonio se añadió  $\text{NH}_3$  o  $\text{ND}_3$  a las disoluciones ácidas del éter-corona (1 mM) en agua/metanol.

Los análisis experimentales de los complejos (ESI-FT-ICR IRMPD) se han realizado tal y como se describe en el capítulo introductorio de este bloque. Los espectros IRMPD se han construido monitorizando la corriente de iones asociada a la fragmentación del ión dominante, que ha sido en todos los casos el éter-corona protonado generado por la pérdida de una molécula de agua o de amoniaco del huésped. Se observaron también señales menos intensas en las masas de fragmentos (protonados) asociados con la pérdida adicional de dos o tres unidades ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ) del anillo del poliéter. La pronunciada banda asociada a la tensión del C–O se analizó repetidamente con distintas potencias atenuadas del láser para evitar la saturación potencial de la misma, como consecuencia del agotamiento de los complejos en la línea del haz láser durante la realización del experimento.

### Cálculos químico cuánticos.

Las asignaciones vibracionales y conformacionales de los espectros se realizaron mediante cálculos mecano-cuánticos empleando una metodología similar a la descrita en detalle en la referencia [24] y en el capítulo 8 de esta memoria.

De forma general, los conformeros potenciales de los complejos se han explorado mediante “simulated annealing” con el campo de fuerza de Dreiding. Las estructuras de menor energía resultantes de este proceso se optimizaron aplicando la teoría de la densidad funcional con un nivel de teoría B3LYP/6-31++G(d,p). En particular, se reoptimizaron más de una decena de configuraciones para cada complejo, considerándose siempre las estructuras no duplicadas resultado del intercambio del amonio por el hidronio. Para reducir los errores derivados de la superposición de bases se aplicó el método counterpoise. No se impusieron restricciones de simetría a los conformeros. Todos los cálculos se realizaron con el paquete Gaussian 03 [33].

Los espectros de infrarrojo fueron generados mediante la combinación de los modos de vibración de las estructuras optimizadas con un ensan-

chamiento de línea de  $8\text{ cm}^{-1}$  fwhm. Las frecuencias vibracionales teóricas para todos los complejos se redimensionaron para poder compararlas con el experimento, aplicando un factor de 0.98, en la línea de las recomendaciones aportadas por estudios previos [34] al aplicar este nivel de teoría.

## 10.3. Discusión de resultados

Las figuras 10.1, 10.2 y 10.3 muestran los espectros IRMPD (obtenidos experimentalmente) junto con los espectros B3LYP (teóricos) correspondientes a los conformeros de menor energía, que contribuirán con toda probabilidad de forma más relevante a los resultados del experimento. Las estructuras moleculares de los conformeros más estables de los complejos estudiados se representan en las figuras 10.4 y 10.5.

Todos los conformeros implican la coordinación del huésped con el poliéter mediante la disposición del catión en forma de trípode, con los tres hidrógenos orientados hacia el anillo y coordinados con tres oxígenos del esqueleto del poliéter. Sólo se encontraron indicios de coordinación bifurcada para algunos conformeros (más energéticos) en el caso de los complejos del 15-crown-5 (por ejemplo el conformero II 15c5- $\text{NH}_4^+$  de la figura 10.5). En estas conformaciones, un enlace O–H o N–H del catión interacciona con un par de oxígenos del éter de un modo prácticamente simétrico.

Es importante resaltar que para los complejos con  $\text{NH}_4^+$  no se han encontrado disposiciones moleculares en las que participen los cuatro enlaces N–H entre los conformeros obtenidos en el intervalo de energías de hasta 40 kJ/mol, sobre el conformero más estable. Un análisis específico mostró que los conformeros con estructuras plegadas en forma de “jaula”, con cuatro oxígenos del 18c6 y del 15c5 coordinados con el catión  $\text{NH}_4^+$ , son inestables y migran de forma sistemática hacia disposiciones moleculares más abiertas, en forma de trípode.

Cada uno de los espectros IRMPD incluidos en este capítulo muestra una serie de bandas vibracionales diferenciadas cuya asignación se indica en la tabla 10.1. Las bandas más intensas, nombradas con letras mayúsculas de la A a la G, están asocia-

Tabla 10.1: **Asignación de los modos vibracionales, según el cálculo B3LYP/6-31++G(d,p), de las principales bandas observadas en los espectros IRMPD de los complejos del 15c5 y el 18c6 con amonio, hidronio y sus variantes deuteradas.** El tipo de vibración dominante (en negrita) y las vibraciones secundarias más significativas se indican en cada caso. Las bandas se denotan por letras de la A a la G para los modos vibracionales asociados al hospedador, y con letras minúscula de la h a la s para los modos asociados predominantemente a las vibraciones del huésped protonado.

| Modos vibracionales del éter-corona      |   |
|--|---|
| Banda                                    | Modo asignado   |
| <b>A</b>                                 | <b>tensión C–O</b> ; ; flexión COC  |
| <b>B</b>                                 | <b>tensión C–C</b> ;<br>rocking del CH <sub>2</sub> , flexión COC   |
| <b>C</b>                                 | <b>wagging del CH<sub>2</sub></b>   |
| <b>D</b>                                 | <b>twisting del CH<sub>2</sub></b>  |
| <b>E</b>                                 | <b>tensión C–C</b> ; tensión C–O  |
| <b>F</b>                                 | <b>flexión del CH<sub>2</sub></b>   |
| <b>G</b>                                 | <b>rocking del CH<sub>2</sub></b> ; flexión COC   |
| Modos vibracionales del catión (huésped) |   |
| Banda                                    | Modo asignado   |
| <b>h</b>                                 | <b>paraguas NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b><br>(paralelo al anillo del éter)                                   |
| <b>k</b>                                 | <b>flexión del NH<sub>2</sub> o OH<sub>2</sub></b>  |
| <b>m</b>                                 | <b>paraguas NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></b><br>(perpendicular al anillo del éter) |
| <b>n</b>                                 | <b>twisting del OH<sub>2</sub></b>  |
| <b>s</b>                                 | <b>tensión del NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b><br>(tentativa ref. [?, ?])                                      |

das con modos vibracionales del éter-corona (hospedador). Los modos dominantes asociados con las moléculas huésped (protonadas) también forman parte del intervalo espectral cubierto por los presentes experimentos, y están etiquetadas en los espectros con letras minúscula de la h a la s.

Las vibraciones de la estructura del éter-corona implican tensiones simétricas y antisimétricas de los grupos C–O–C (A) y C–C (B) a lo largo del anillo, así como flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (*wagging* (C) y *twisting* (D), respectivamente), torsiones (*bending* (E)), y flexiones asimétricas en el plano (*rocking* (F)) de los grupos CH<sub>2</sub> [22–24]. La posición y la forma de estas bandas proporcionan información sobre la coordina-

ción entre el éter-corona y el huésped protonado. En concreto, la forma de la banda intensa asociada con la tensión C–O–C (A) cambia de forma apreciable de un complejo a otro. Esto se debe fundamentalmente a la clara división de las tres o cuatro componentes principales que conforman la banda A, en las diferentes estructuras de coordinación, lo cual está justificado por los cálculos B3LYP.

Las vibraciones del catión huésped, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pueden describirse como movimientos de tipo “paraguas” (h,m), así como de torsión de los ángulos de enlace (k) del H<sub>2</sub>O o el NH<sub>2</sub> y como el *twisting* de un grupo H<sub>2</sub>O alrededor del eje del tercer enlace O–H (n). Las posiciones de estas bandas se muestran mediante barras verticales en las figuras 1-3, lo cual ayuda a su identificación y a la interpretación de los desplazamientos sistemáticos hacia frecuencias más bajas, asociados con la deuteración del huésped. El análisis de los cálculos B3LYP pone de manifiesto que los modos del huésped se acoplan fácilmente con los de los grupos CH<sub>2</sub> del éter-corona. En concreto, el modo vibracional h (movimiento de “paraguas” paralelo al anillo del éter-corona) en el complejo 15c5–NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se divide en dos componentes principales (Fig.10.2) que pueden atribuirse al acoplamiento con los modos de vibración asociados al *bending* o el *wagging* del CH<sub>2</sub> del hospedador.

En los espectros IRMPD medidos experimentalmente no aparecen algunos de los modos vibracionales asociados con los huéspedes protonados que predice el cálculo B3LYP. Este efecto se observa claramente, al menos, para el modo designado como m (movimiento de “paraguas” perpendicular al anillo), y puede interpretarse como un signo de efectos no armónicos asociados con movimientos de gran amplitud de las fracciones H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, en el entorno restrictivo de la red de coordinación hospedador-huésped. Los modos de vibración no armónicos inducen desplazamientos y ensanchamientos de las bandas, que los cálculos armónicos de frecuencias no pueden caracterizar de forma adecuada [35]. Asimismo, su excitación multifotónica puede ser menos eficiente en los experimentos IRMPD [32].

A la inversa, puede observarse una banda ancha en los espectros IRMPD de los complejos 18c6 y 15c5 con NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, alrededor de los 1400 cm<sup>-1</sup> (banda

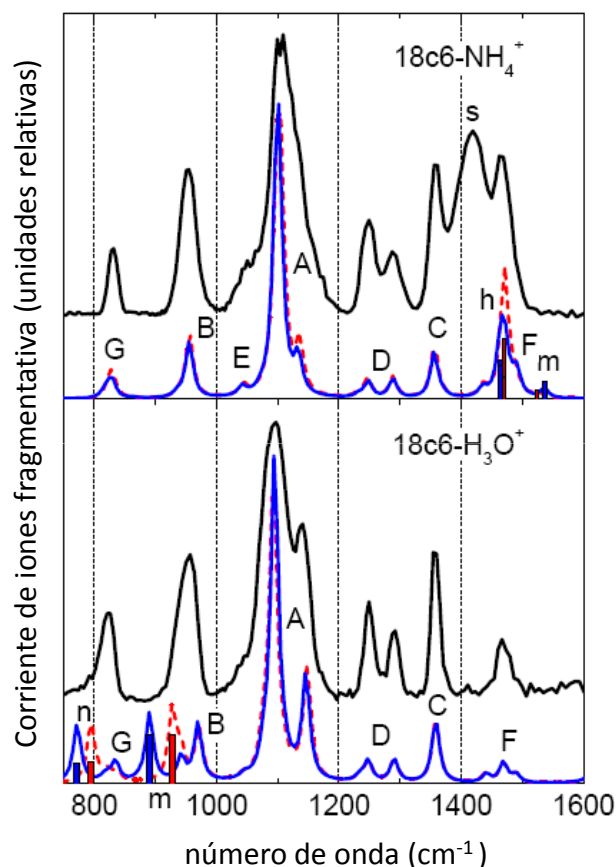


Figura 10.1: **Espectros infrarrojo de los complejos  $18c6-NH_4^+$  y  $18c6-H_3O^+$ .** Los espectros experimentales IRMPD se representan por las curvas de color negro situadas en la parte superior de cada panel. En la parte inferior se representan los espectros resultantes de los cálculos B3LYP/6-31++G(d,p) (siendo la línea de color azul la asociada al conformero I y la punteada de color rojo la correspondiente al conformero II. Ver figura 10.4). El espectro B3LYP se ha construido aplicando un ensanchamiento de línea de  $8\text{ cm}^{-1}$  fwhm. La tabla 10.1 muestra la asignación de los modos vibracionales más significativos. Las barras verticales indican las transiciones asociadas con los modos vibracionales del hospedador:  $NH_4^+$  o  $H_3O^+$ .

s), que no predice el cálculo B3LYP. Esta banda desaparece de forma clara en el complejo  $15c5-ND_4^+$ , lo cual corrobora que está asociada al huésped amonio. Cálculos cuánticos multidimensionales, realizados previamente para el estudio de otros

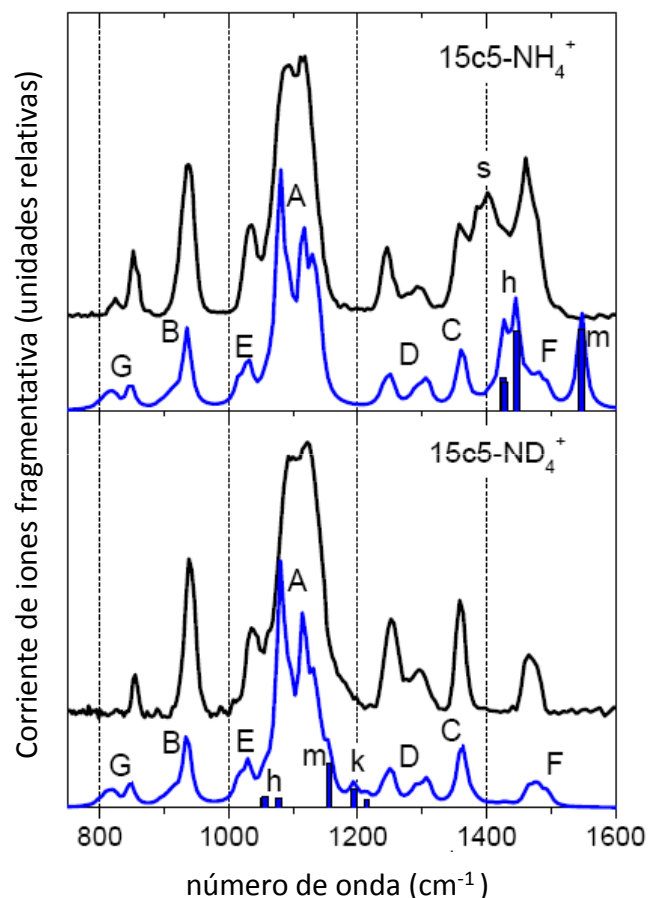


Figura 10.2: **Espectros infrarrojo de los complejos  $15c5-NH_4^+$  y su variante deuterada  $15c5-ND_4^+$ .** Los espectros experimentales IRMPD se representan por las curvas de color negro situadas en la parte superior de cada panel, mientras que los espectros calculados teóricamente (B3LYP/6-31++G(d,p)) del conformero más estable en cada caso (ver figura 10.5, se representan en la parte inferior. El espectro B3LYP se ha construido aplicando un ensanchamiento de línea de  $8\text{ cm}^{-1}$  fwhm. La tabla 10.1 muestra la asignación de los modos vibracionales más significativos. Las barras verticales indican las transiciones asociadas con modos vibracionales del hospedador:  $NH_4^+$  o  $ND_4^+$ .

complejos con amonio [29,30], asignaron las bandas observadas en los espectros IRMPD en este mismo intervalo espectral, a la combinación de tensiones N–H simétricas y antisimétricas. En nuestro caso, la banda s podría estar asociada con desplazamientos no armónicos de bandas como m y h, que sí

aparecen en el espectro calculado B3LYP. En todo caso, se requeriría un estudio computacional más exhaustivo que el que hemos realizado, para obtener conclusiones definitivas acerca del origen de la banda s, que pudieran aplicarse de forma general a los complejos formados por el amonio.

Los espectros IRMPD de los sistemas  $18\text{c}6\text{--NH}_4^+$ ,  $18\text{c}6\text{--H}_3\text{O}^+$  y  $15\text{c}5\text{--NH}_4^+/\text{ND}_4^+$  muestran estructuras vibracionales bien definidas, que son reproducidas de forma precisa por el espectro armónico calculado teóricamente. Por el contrario, los espectros IRMPD de los complejos  $15\text{c}5\text{--H}_3\text{O}^+/\text{D}_3\text{O}^+$  muestran bandas ensanchadas. A pesar de que estos últimos espectros poseen una apariencia ruidosa, los espectros fueron reproducidos de forma consistente, en barridos independientes, realizados sobre muestras distintas, y aplicando distintas potencias láser en cada caso.

En los espectros IRMPD de los complejos  $15\text{c}5\text{--hidronio}$  las bandas vibracionales principales se extienden sobre un amplio intervalo espectral y muestran cambios sustanciales en su estructura e intensidades relativas, en comparación con los espectros de infrarrojo de los complejos análogos formados con el catión amonio. Este hallazgo constituye una prueba de la existencia de acoplamientos vibracionales que dan lugar a nuevos canales de redistribución de la energía interna de los complejos durante el proceso IRMPD. Veremos más adelante, que nuestro estudio atribuye el ensanchamiento de las bandas vibracionales observado en este caso, a una deslocalización parcial del protón a lo largo de uno de los enlaces intermoleculares  $\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{O}$  del complejo crown15-hidronio. En investigaciones IRMPD realizadas previamente, sobre dímeros de diversas moléculas polares (incluidos éteres) estabilizados por puentes protónicos [25, 28–30, 32, 36–38], se han observado efectos similares, desde un punto de vista cualitativo.

A continuación describiremos la estructura de los conformeros más estables resultados del cálculo B3LYP, con el objetivo de proporcionar una visión más detallada de los fenómenos de localización de la carga y de la actuación del protón, como puente en la interacción huésped–hospedador. Las figuras 10.4 y 10.5, y la tabla ?? describen dichas estructuras, avaladas por el buen acuerdo que existe entre los espectros IRMPD medidos experimentalmente,

y los calculados de forma teórica.

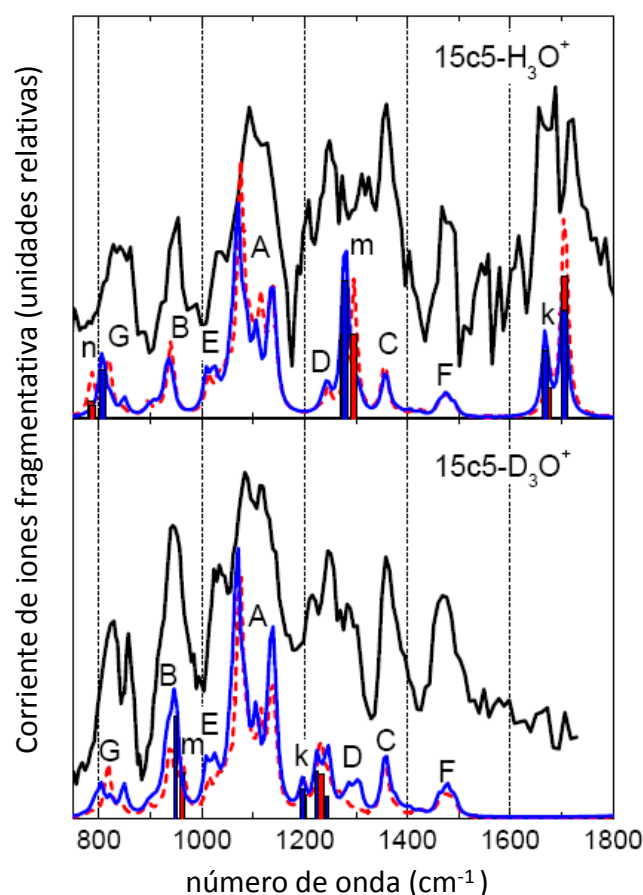


Figura 10.3: **Espectros infrarrojo del complejo  $15\text{c}5\text{--H}_3\text{O}^+$  y su variante deuterada  $15\text{c}5\text{--D}_3\text{O}^+$ .** Los espectros experimentales IRMPD se representan por las curvas de color negro situadas en la parte superior de cada panel. Los espectros calculados teóricamente (B3LYP/6-31++G(d,p)) correspondientes a los dos conformeros de menor energía se representan por las curvas de color azul y color rojo (conformero I y II, respectivamente; ver figura 10.5). Los espectros B3LYP se han construido aplicando un ensanchamiento de líneas de  $8\text{ cm}^{-1}$  fwhm. La tabla 10.1 muestra la asignación de los principales modos vibracionales. Las barras verticales indican las transiciones asociadas con modos vibracionales del hospedador:  $\text{H}_3\text{O}^+$  o  $\text{D}_3\text{O}^+$ . El mayor ensanchamiento de las bandas del espectro IRMPD medido para el sistema  $15\text{c}5\text{--H}_3\text{O}^+$  puede interpretarse como una manifestación de la deslocalización protónica a lo largo del puente de hidrógeno de menor longitud, establecido entre el éter y el catión hidronio.

Tabla 10.2: Principales parámetros estructurales de los tres conformeros de menor energía de los complejos del 15c5 y el 18c6 con  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  (conformeros I, II y III), que resultan del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). Las series de datos comienzan con el átomo de oxígeno más próximo al protón y continúan en sentido horario, de acuerdo con la representación de la vista superior de los conformeros de las figuras 10.4 y 10.5. Las entradas entre paréntesis en la segunda columna corresponden a las distancias entre los átomos de H del huésped protonado y los dos átomos de oxígeno más próximos del anillo del éter-corona. Las últimas tres columnas hacen referencia al esqueleto molecular del éter-corona exclusivamente. La simetría de los conformeros puede verse en la primera columna.

| Conformero   | $\text{NH}^+\cdots\text{O}(\text{éter})$ o<br>$\text{OH}^+\cdots\text{O}(\text{éter})$<br>distancias (Å) | éter O–O<br>distancias<br>(Å)            | C–O–C<br>ángulos de enlace                     | O–C–C–O<br>ángulos dihedro                  |
|--|--|--|--|---|
| <b>18c6-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>I</b> ( $C_{3v}$ )<br>0 kJ mol <sup>-1</sup>            | (1.85,2.56),<br>(1.85,2.56),<br>(1.85,2.56)  | 2.86, 2.86,<br>2.86, 2.86,<br>2.86, 2.86 | 112.9, 114.0,<br>112.9, 114.0,<br>112.9, 114.0 | 65.5, -65.5,<br>65.5,-65.5,<br>65.5, -65.5  |
| <b>18c6-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>II</b> ( $C_{3v}$ )<br>1.03 kJ mol <sup>-1</sup>        | (1.87,2.55),<br>(1.87,2.55),<br>(1.87,2.55)  | 2.87, 2.87,<br>2.87, 2.87,<br>2.87, 2.87 | 113.6, 113.2,<br>113.6, 113.2,<br>113.6, 113.2 | -66.0, 66.0,<br>-66.0, 66.0,<br>-66.0, 66.0 |
| <b>18c6-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>III</b> ( $C_s$ )<br>10.5 kJmol <sup>-1</sup>           | (1.85,2.60),<br>(1.85,2.57),<br>(1.90,2.59)  | 2.89, 2.85,<br>2.85, 2.89,<br>2.85, 2.85 | 115.3, 113.5,<br>113.4, 113.5,<br>115.3, 113.3 | -62.1, 65.0,<br>-64.7, 62.6,<br>65.4, -66.1 |
| <b>18c6-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>I</b> ( $C_{3v}$ )<br>0 kJ mol <sup>-1</sup>     | (1.74,2.54),<br>(1.74,2.54),<br>(1.74,2.54)  | 2.81, 2.81,<br>2.81, 2.81,<br>2.81, 2.81 | 112.1, 113.8,<br>112.1, 113.8,<br>112.1, 113.8 | 63.6, -63.6,<br>63.6, -63.7,<br>63.7, -63.7 |
| <b>18c6-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>II</b> ( $C_{3v}$ )<br>0.08 kJ mol <sup>-1</sup> | (1.74,2.54),<br>(1.74,2.54),<br>(1.74,2.54)  | 2.81, 2.81,<br>2.81, 2.81,<br>2.81, 2.81 | 112.1, 113.9,<br>112.1, 113.9,<br>112.1, 113.9 | -63.4, 63.4,<br>-63.5, 63.5,<br>-63.5, 63.4 |
| <b>18c6-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>III</b> ( $C_1$ )<br>12.2 kJ mol <sup>-1</sup>   | (1.65,2.55),<br>(1.67,2.52),<br>(1.70,2.54)  | 2.87, 2.73,<br>2.76, 2.84,<br>2.80, 2.80 | 114.9, 115.2,<br>112.9, 114.5,<br>112.5, 113.8 | -65.8, 55.7,<br>57.9, -66.6,<br>61.9, 63.6  |
| <b>15c5-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>I</b> ( $C_1$ )<br>0 kJ mol <sup>-1</sup>               | (1.78,2.58),<br>(1.96,2.36),<br>(1.84,2.54)  | 2.91, 2.85,<br>3.00, 2.82,<br>2.81       | 115.0, 113.9,<br>115.2, 115.1,<br>115.2        | -63.3, 58.6,<br>70.1, 64.9,<br>-63.6        |
| <b>15c5-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>II</b> ( $C_1$ )<br>6.45 kJ mol <sup>-1</sup>           | (1.77,2.60),<br>(1.85,2.53),<br>(2.08, 2.24)   | 2.83, 2.77,<br>2.92, 2.83,<br>2.96       | 114.9, 115.7,<br>113.6, 116.6,<br>115.6        | 65.9, -60.2,<br>59.0, 60.6,<br>69.0         |
| <b>15c5-<math>\text{NH}_4^+</math></b><br><b>III</b> ( $C_1$ )<br>6.84 kJ mol <sup>-1</sup>          | (1.78,2.54),<br>(1.84,2.41),<br>(1.87,2.47)  | 2.80, 2.80,<br>2.99, 2.82,<br>2.81       | 114.3, 116.3,<br>113.9, 116.1,<br>115.6        | 61.4, -63.7,<br>65.3, 65.6,<br>-60.8        |
| <b>15c5-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>I</b> ( $C_1$ )<br>0 kJ mol <sup>-1</sup>        | (1.55,2.52),<br>(1.76,2.27),<br>(1.60,2.42)  | 2.88, 2.78,<br>3.00, 2.78,<br>2.80       | 115.2, 115.3,<br>115.8, 115.8,<br>115.9        | -63.6, 56.1,<br>70.4, 63.5,<br>63.4         |
| <b>15c5-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>II</b> ( $C_1$ )<br>0.71 kJ mol <sup>-1</sup>    | (1.55,2.49),<br>(1.62,2.31),<br>(1.62,2.38)  | 2.81, 2.77,<br>3.00, 2.78,<br>2.80       | 114.2, 116.6,<br>114.9, 116.7,<br>116.1        | 62.2, -63.1,<br>67.2, 64.4,<br>-61.0        |
| <b>15c5-<math>\text{H}_3\text{O}^+</math></b><br><b>III</b> ( $C_1$ )<br>5.48 kJ mol <sup>-1</sup>   | (1.53,2.54),<br>(1.61,2.39),<br>(1.81,2.21)  | 2.82, 2.75,<br>2.95, 2.76,<br>2.92       | 115.5, 116.1,<br>114.1, 117.1,<br>116.6        | 65.5, -60.1,<br>61.2, 56.4,<br>67.4         |

Los complejos  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+/\text{NH}_4^+$  se estabilizan en conformaciones de simetría  $C_{3v}$ , en las que se observan tres puentes de hidrógeno prácticamente lineales. Las conformaciones alternativas, en las cuales los puentes de hidrógeno están bifurcados entre dos oxígenos adyacentes del éter, corresponden en el cálculo matemático a puntos de silla en lugar de a mínimos locales. Estos resultados son coherentes con los publicados en estudios previos [1–3].

El complejo  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+$  muestra dos conformeros aproximadamente isoenergéticos de simetría  $C_{3v}$  (I y II en la figura 10.4) en los cuales el hidronio se sitúa ligeramente sobre el plano de la estructura abierta del éter-corona, y se coordina bien con los tres oxígenos del éter orientados hacia arriba (hacia el catión), o bien con los tres que se orientan hacia abajo. Es interesante que la conversión entre estos conformeros pueda alcanzarse tanto por rotación como por inversión del  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

El complejo  $18\text{c}6\text{-NH}_4^+$  muestra dos conformeros con rasgos similares pero con una forma más piramidal y distancias interatómicas más largas de los puentes de hidrógeno. Los dos conformeros están en este caso un poco más separados en energía relativa, aunque dicha variación es sólo de 1 kJ/mol. El conformero más estable corresponde a una inclusión un poco más profunda del amonio en la cavidad del poliéter, formando una estructura de coordinación mediante puentes de hidrógeno en forma de trípode con los oxígenos del éter que apuntan hacia abajo, con respecto a la posición del huésped. La pequeña diferencia en los valores de energía libre entre los conformeros de cada uno de los complejos del 18c6, sugiere que los espectros IRMPD, registrados a temperatura ambiente, deberían de compararse con el promedio de los dos espectros B3LYP mostrados en la figura 10.1.

Los conformeros de mayor energía de los complejos  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+$  y  $18\text{c}6\text{-NH}_4^+$ , más próximos a los que mostramos en este estudio, adoptan conformaciones parcialmente plegadas (conformero III en la figura 10.4) y se sitúan a más de 10 kJ/mol de distancia sobre los conformeros  $C_{3v}$ . El conformero III del complejo  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+$  es virtualmente isoenergético con un cuarto conformero de simetría  $C_s$  (que no se muestra), que sería similar desde un punto de vista cualitativo al conformero III  $C_s$  del

complejo  $18\text{c}6\text{-NH}_4^+$ .

Los complejos  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+/\text{NH}_4^+$  se estabilizan mediante conformaciones asimétricas (no planas) con simetrías en las que el éter y el catión no se acoplan de forma conmensurable. Para modelar teóricamente estos complejos se llevó a cabo una búsqueda conformacional inicial particularmente exhaustiva.

La figura 10.5 muestra que los conformeros más estables I, II y III, obtenidos para el para 15c5 con  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ , son similares desde el punto de vista cualitativo, aunque existen diferencias en sus valores relativos de energía libre. Merece la pena mencionar que sus características conformacionales coinciden cualitativamente con las postuladas para el complejo  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+$  en disolución con dicloroetano [1].

Todos los conformeros muestran un puente de hidrógeno prácticamente lineal ( $\approx 175^\circ$ ) y dos no lineales ( $140^\circ\text{--}165^\circ$  para el  $\text{H}_3\text{O}^+$ ;  $125^\circ\text{--}165^\circ$  para el  $\text{NH}_4^+$ ) entre los oxígenos del éter y el catión. Solo tres de los oxígenos del éter están implicados en el enlace del catión, dando lugar a estructuras en las que dos de estos oxígenos se encuentran a distancias más largas del catión. Tan solo en el caso del conformero II del complejo  $15\text{c}5\text{-NH}_4^+$ , uno de los puentes de hidrógeno está compartido parcialmente por dos oxígenos, que difieren en 0.16 Å en sus distancias al enlace N–H.

En los complejos del 15c5 el puente de hidrógeno lineal es sistemáticamente el más corto. Debido a esta asimetría de los puentes de hidrógeno, cabe esperar que la densidad de carga del protón implicado en el enlace lineal sea más grande que la de los otros enlaces. Los conformeros I, II y III del complejo  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+$  muestran un puente de hidrógeno particularmente corto de  $\approx 1.55$  Å con una distancia entre el oxígeno del agua y el del éter de 2.56 Å. Las distancias interatómicas análogas para el complejo  $15\text{c}5\text{-NH}_4^+$  ascienden a *ca.* 1.78 Å y 2.81 Å, y para el complejo  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+$  a 1.74 Å y 2.73 Å. De ahí que sólo el sistema  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+$  presente distancias interatómicas típicas de puentes de hidrógeno  $\text{O-H}^+\cdots\text{O}$  fuertes [39]. Tales distancias son de hecho similares a las que se han descrito para otros sistemas, como  $\text{HOH}\cdot\text{OH}^-$  [26] y  $\text{HOH}\cdot\text{O}^-$  [27].



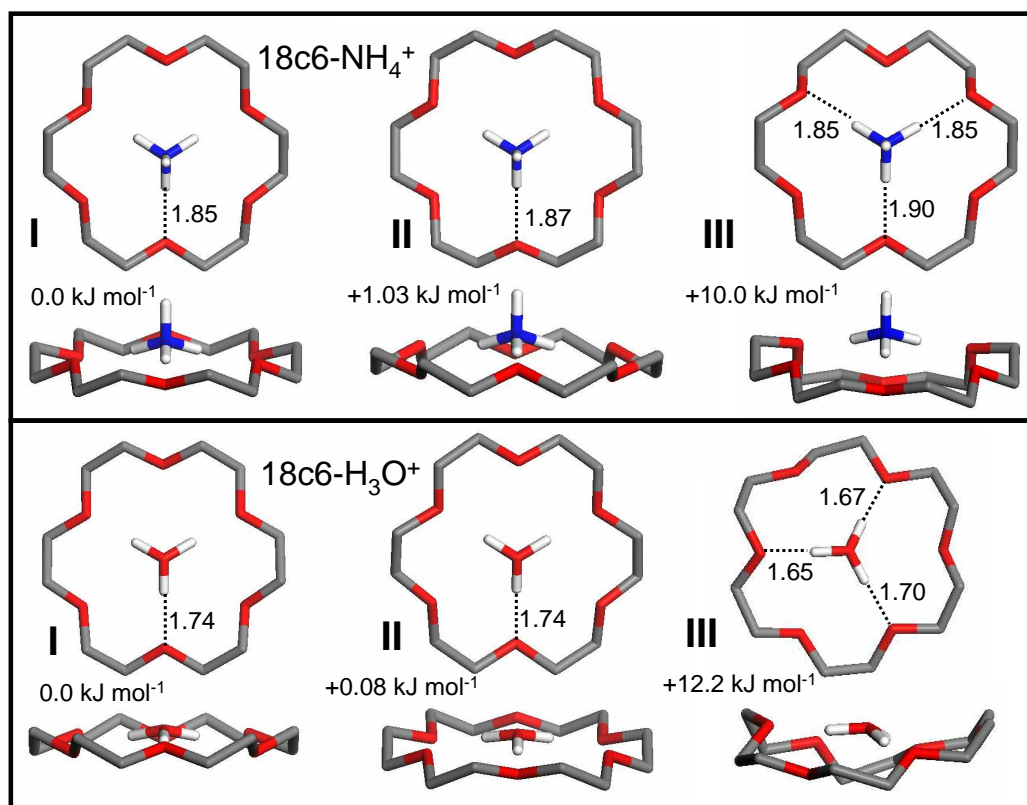


Figura 10.4: Representación gráfica de los conformeros de menor energía de los complejos del 18c6 con  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  resultado del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). Oxígenos en rojo, carbonos en gris, hidrógenos en blanco. Los hidrógenos del éter-corona se han omitido para dar mayor claridad a la figura. Las distancias (huésped) $\text{H}^+ \cdots \text{O}(\text{crown})$  más cortas (in Å) se indican en cada figura. Los parámetros geométricos más relevantes de cada uno de los conformeros se recogen en la tabla ??.

Por el contrario, los puentes de hidrógeno más largos de los complejos  $15\text{c}5\text{-NH}_4^+$ ,  $18\text{c}6\text{-H}_3\text{O}^+$  y  $18\text{c}6\text{-NH}_4^+$ , están más próximos a los puentes de hidrógeno típicos de fuerza intermedia [39]. Estos hallazgos, junto con la menor afinidad protónica del agua en comparación con el amonio, apoya la compartición del protón entre huésped y hospedador en el sistema  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+$ .

De acuerdo con las presentes observaciones, los efectos de deslocalización del protón son lo suficientemente fuertes como para ensanchar de forma apreciable las bandas del espectro IRMPD registradas para el sistema  $15\text{c}5\text{-H}_3\text{O}^+$ . La deslocalización del protón en el enlace afecta al conjunto de modos vibracionales del complejo debido a su acoplamiento con movimientos vibracionales no armónicos de gran amplitud del protón que se comparte de forma parcial.

El impacto de la deslocalización protónica en la espectroscopia IRMPD se ha descrito en detalle mediante cálculos cuánticos *ab initio* de dinámica molecular en sistemas relacionados, en concreto, en los constituidos por dos éteres [36–38].

Esos estudios teóricos han explicado los desplazamientos, divisiones y ensanchamientos de las bandas vibracionales en los espectros IRMPD, en términos del acoplamiento dinámico entre el protón compartido y los modos vibracionales del complejo. Tal acoplamiento lleva a una modulación dependiente de la temperatura, que transforma suavemente las bandas estrechas observadas en espectros analizados a baja temperatura de un único protón, en la estructura ensanchada del complejo de los espectros IRMPD registrados a temperatura ambiente [38].



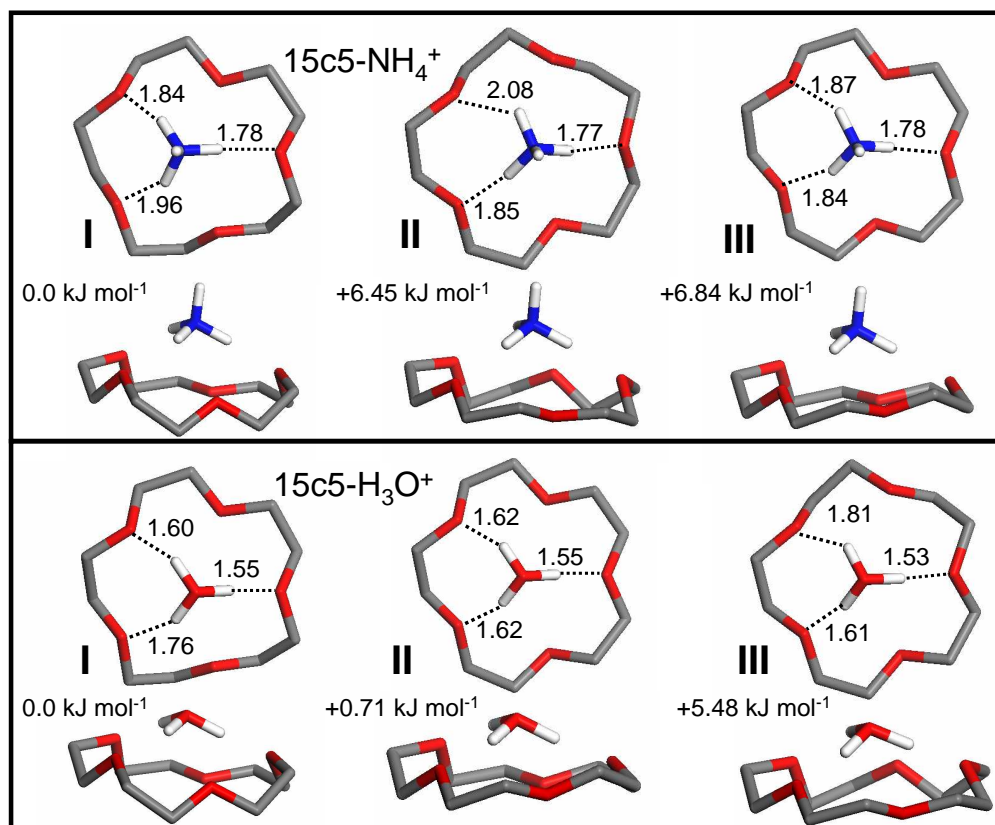


Figura 10.5: Representación gráfica de los conformeros más estables de los complejos del 15c5 con  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  resultantes del cálculo B3LYP/6-31++G(d,p). Oxígenos en rojo, carbonos en gris, hidrógenos en blanco. Los hidrógenos del éter-corona se han omitido para dar mayor claridad a la figura. Las distancias (huésped) $\text{H}^+ \cdots \text{O}(\text{crown})$  más cortas (in Å) se indican en cada caso. Los parámetros geométricos más relevantes de cada una de los conformeros se recogen en la tabla ??.

El hecho de que en la investigación que nos ocupa sólo se observen los efectos de ensanchamiento de las bandas en el caso de los complejos 15c5- $\text{H}_3\text{O}^+/\text{D}_3\text{O}^+$  es consistente con el puente de hidrógeno más corto que predice el cálculo B3LYP para estos sistemas.

Es difícil postular mecanismos alternativos, que no impliquen la compartición del protón, que expliquen de forma clara las diferencias del comportamiento IRMPD del complejo 15c5- $\text{H}_3\text{O}^+$  en comparación con el 15c5- $\text{NH}_4^+$ , el 18c6- $\text{H}_3\text{O}^+$  y el 18c6- $\text{NH}_4^+$ .

Nuestro estudio conformacional no encontró ninguna evidencia de la participación simultánea de múltiples conformeros que pueda explicar la expansión de las bandas vibracionales en los experimentos IRMPD.

## 10.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos del análisis de los complejos formados por los éteres-corona 18c6 y 15c5 con  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  en fase gaseosa, mediante la combinación de la espectroscopia IRMPD y cálculos B3LYP, han proporcionado una nueva visión acerca del papel del protón como intermediario para la estabilización de este tipo de complejos.

En el caso de los complejos formados por el poliéter 18c6 con  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ , los resultados confirman la adopción de una estructura abierta por parte del éter, de simetría  $C_{3v}$ , acorde con la coordinación del éter-corona con ambos huéspedes mediante tres puentes de hidrógeno lineales. En cambio, en los complejos del 15c5, el anillo del éter adopta conformaciones parcialmente plegadas que

dan lugar a estructuras asimétricas con geometría piramidal, al coordinarse el éter-corona con el catión. Como principal característica, estos complejos muestran un puente de hidrógeno lineal más corto y dos de mayor longitud, en contraposición a lo observado en el caso del 18c6. La coordinación  $\text{O}-\text{H}^+\cdots\text{O}(\text{éter})$  y  $\text{N}-\text{H}^+\cdots\text{O}(\text{éter})$  muestra distancias interatómicas típicas de puentes de hidrógeno de fuerza intermedia. La compartición de protones es despreciable en los complejos  $15\text{c}5-\text{NH}_4^+$ ,  $18\text{c}6-\text{H}_3\text{O}^+$  y  $18\text{c}6-\text{NH}_4^+$ , todos los cuales muestran bandas IRMPD bien definidas, en buen acuerdo con las predicciones B3LYP.

Por el contrario, el complejo  $15\text{c}5-\text{H}_3\text{O}^+$  presenta distancias más cortas entre el éter y el catión, lo que genera puentes de hidrógeno más fuertes. Los espectros IRMPD de los complejos  $15\text{c}5-\text{H}_3\text{O}^+$  y  $15\text{c}5-\text{D}_3\text{O}^+$  se diferencian de los del resto de complejos estudiados por cambios sustanciales en las intensidades, anchura, y en general, en la forma de las bandas vibraciones. Estos rasgos espectrales pueden interpretarse como resultado de

la deslocalización parcial del protón a lo largo del puente de hidrógeno lineal. Tal interpretación se apoya en efectos espectrales similares observados en estudios previos de sistemas con protones compartidos [25, 28–30, 32, 36–38]. La función de onda de un protón compartido se espera que se concentre en el puente de hidrógeno más corto del complejo  $15\text{c}5-\text{H}_3\text{O}^+$ . No obstante, la deslocalización del protón puede tener un carácter dinámico, modulado por los movimientos de vibración internos del huésped hidronio, y también implicar los enlaces no lineales más largos. Una descripción precisa de estas características requeriría cálculos cuánticos multidimensionales [37, 38], así como la realización de experimentos espectroscópicos adicionales que analizaran las regiones C–H/O–H/N–H.

Como consideración general, el presente estudio ilustra que la sensibilidad de la espectroscopia IRMPD a la no armonicidad y los efectos de acoplamiento vibracional, es útil para analizar los efectos de la deslocalización protónica en complejos supramoleculares de éteres cíclicos y sistemas de naturaleza similar.

---

## Bibliografia

---

- [1] A. Varnek, G. Wipff, A. Famulari, M. Raimondi, T. Vorobeva, E. Stoyanov. *Complexes of the  $H_5O_2^+$  and  $H_3O^+$  cations with polyethers in water saturated dichloroethane solutions. A combined IR spectroscopic and quantum mechanics study.* Journal of the Chemical Society 2 (5): 887-893 (2002)
- [2] G. Wipff, *Hydronium Ion complex of 18c6: where are the protons? A DFT study of static and dynamic properties.* Journal of the American Chemical Society 124 (16): 4473-4480 (2002)
- [3] M. Bühl, R. Ludwig, R. Schurhammer, G. Wipff. *Hydronium Ion complex of 18c6: theory confirms three "normal" linear H-bonds.* Journal of Physical Chemistry A 108 (51): 11463-11468 (2004)
- [4] E.S. Stoyanov, C.A. Reed. *Unexpected IR characteristics of H-bonds in the 18c6 ether complex of the  $H_3O^+$  Hydronium ion. Can the location of the proton be specified?* Journal of Physical Chemistry A 108 (5): 907-913 (2004)
- [5] J. Kriz, J. Dybal, E. Makrlík, J. Budka. *Interaction of Hydronium Ion with Dibenzo-18-crown-6: NMR, IR, and Theoretical Study.* Journal of Physical Chemistry A 112 (41): 10236-10243 (2008)
- [6] P.C. Junk. *Crown ethers as stabilising ligands for oxonium ions.* New Journal of Chemistry Articles 32 (5): 762-773 (2008)
- [7] S.J. Cantrill, D.A. Fulton, A.M. Heiss, A.R. Pease, J.F. Stoddart, A.J.P. White, D.J. Williams *The influence of Macrocyclic Polyether Constitution upon ammonium Ion/Crown Ether Recognition Processes.* Chemistry - A European Journal 6 (12): 2274-2287 (2000)
- [8] J.W. Jones, H.W. Gibson. *Ion Pairing and Host-Guest Complexation in Low Dielectric Constant Solvents.* Journal of the American Chemical Society 125 (23): 7001-7004 (2003)
- [9] A.D. Bokare, A. Patnaik *Rotational Flexibility in  $NH_4^+$ -Encapsulated 18-Crown-6 Studied by Molecular Dynamics and Positron Annihilation: Where Does the Positron Localize?* Journal of Physical Chemistry A 109 (7): 1269-1271 (2005)
- [10] J.F. Nierengarten, U. Hahn, T.M. Figueira-Duarte, F. Cardinali, N. Solladie, M.E. Walther, A. Van Dorsselaer, H. Herschbach, E. Leize, A.M. Albrecht-Gary, A. Trabolsi, M. Elhabiri. *Ammonium-crown ether interactions for the construction of fullerene-containing photoactive supramolecular devices.* Comptes Rendus Chimie 9 (7): 1022-1030 (2006)
- [11] Ch. Endicott, H.L. Strauss. *Infrared Hole Burning of Crown Ether 18-c-6 Ammonium Ion Complexes.* Journal of Physical Chemistry A 111 (7): 1236-1244 (2007)
- [12] H.J. Buschmann, R.C. Mutihac, E. Schollmeyer. *Complex formation of 18-crown-6 with metal cations and ammonium ions in dioxane-water mixtures.* Thermochimica Acta 472 (1-2): 17-19 (2008)

- [13] S. Ehala, P. Toman, E. Makrlik, V. Kasicka. *Application of affinity capillary electrophoresis and density functional theory to the investigation of benzo-18-crown-6-ether complex with ammonium cation*. Journal of Chromatography A 1216 (45): 7927-7931 (2009)
- [14] P. Toman, E. Makrlik, P. Vanura. *A combined experimental and theoretical study on the complexation of the ammonium ion with benzo-18-crown-6*. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly 141 (3): 301-304 (2010)
- [15] B.L. Williamson, C.S. Creaser. *Non-covalent inclusion complexes of protonated amines with crown ethers*. International Journal of Mass Spectrometry 188 (1): 53-61 (1999)
- [16] R.R. Julian, J.L. Beauchamp. *Site-specific sequestering and stabilization of charge in peptides by supramolecular adduct formation with 18c6 by way of ESI*. International Journal of Mass Spectrometry 210-211: 613-623 (2001)
- [17] M. Schäfer. *Supramolecular Crown Ether Adducts in the Gas Phase: From Molecular Recognition of Amines to the Covalent Coupling of Host/Guest Molecules*. Angewandte Chemie Int. Ed. 42 (17): 1896-1899 (2003)
- [18] M.L. Colgrave, C.J. Bramwell, C.S. Creaser. *Nanoelectrospray ion mobility spectrometry and ion trap mass spectrometry studies of the non-covalent complexes of amino acids and peptides with polyethers*. International Journal of Mass Spectrometry 229 (3): 209-216 (2003)
- [19] R. Franski, G. Schroeder, W. Kamysz, P. Niedzialkowski, T. Ossowski. *Complexes between some lysine-containing peptides and crown ethers electrospray ionization mass spectrometric study*. Journal of Mass Spectrometry 42 (4): 459-466 (2007)
- [20] H.J. Schneider. *Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes*. Angewandte Chemie Int. Ed. 48 (22): 3924-3977 (2009)
- [21] H. Nagata, H. Nishi, M. Kamigauchi, T. Ishida. *Guest-Dependent Conformation of 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid: Relation to Chiral Separation of Racemic Amino Acids*. Chirality 20 (7): 820-827 (2008)
- [22] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, J.D. Steill, J. Oomens, P.J. Merklings. *Spectroscopic Investigation of the Gas-Phase Conformations of 15-Crown-5 Ether Complexes with  $K^+$* . The Journal of Physical Chemistry A 113 (27): 7748-7752 (2009)
- [23] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, S. Hamad, J. Steill and J. Oomens. *Emergence of Symmetry and Chirality in Crown Ether Complexes with Alkali Metal Cations*. The Journal of Physical Chemistry A 114 (26): 7048-7054 (2010)
- [24] P. Hurtado, A.R. Hortal, F. Gámez, S. Hamad, B. Martínez-Haya. *Gas phase complexes of cyclic and linear polyethers with alkali cations*. Physical Chemistry Chemical Physics 12 (2010) 13752-13758.
- [25] D.T. Moore, J. Oomens, L. van der Meer, G. von Helden, G. Meijer, J. Valle, A.G. Marshall, J.R. Eyler. *Probing the Vibrations of Shared, OH+O-Bound Protons in the Gas Phase*. ChemPhysChem 5 (5): 740-743 (2004)
- [26] E.G. Diken, J.M. Headrick, J.R. Roscioli, J.C. Bopp, M.A. Johnson, A.B. McCoy. *Fundamental Excitations of the Shared Proton in the  $H_3O_2^-$  and  $H_5O_2^+$  Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A 109 (15): 1487-1494 (2005)
- [27] J.R. Roscioli, E.G. Diken, M.A. Johnson, S. Horvath, A.B. McCoy. *Prying Apart a Water Molecule with Anionic H-Bonding: A Comparative Spectroscopic Study of the  $X-H_2O$  ( $X = OH, O, F, Cl$ , and  $Br$ ) Binary Complexes in the 600-3800  $cm^{-1}$  Region*. The Journal of Physical Chemistry A 110 ( ): 4943- (2006)

- [28] J.R. Roscioli, L.R. McCunn, M.A. Johnson. *Quantum Structure of the Intermolecular Proton Bond*. Science 316 (5822): 249-254 (2007)
- [29] K.R. Asmis, Y. Yang, G. Santambrogio, M. Brümmer, L.R. McCunn, J.R. Roscioli, M.A. Johnson, O. Kühn, D.J. Goebbert. *Gas-Phase IR spectroscopy and multidimensional QM calculations of the protonated ammonia dimer*. Angewandte Chemie International Edition 46 (45): 8691-8694 (2007)
- [30] Y. Yang, O. Kühn, G. Santambrogio, D.J. Goebbert, K.R. Asmis. *Vibrational signatures of H-bonding in the protonated ammonia clusters  $NH_4+(NH_3)_{1-4}$* . The Journal of Chemical Physics 129 (22): 224302 (2008)
- [31] L.R. McCunn, J.R. Roscioli, M.A. Johnson, A.B. McCoy. *An H/D Isotopic Substitution Study of the  $H_5O_2+Ar$  Vibrational Predissociation Spectra: Exploring the Putative Role of Fermi Resonances in the Bridging Proton Fundamentals*. The Journal of Physical Chemistry B 112 (2): 321-327 (2008)
- [32] J. Oomens, J.D. Steill, B. Redlich. *Gas-Phase IR Spectroscopy of Deprotonated Amino Acids*. Journal of The American Chemical Society 131 (12): 4310-4319 (2009)
- [33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, S.A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople. *Gaussian 03, revisión C.02*. Gaussian Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- [34] S.Z. Fairchild, C.F. Bradshaw, W. Su, S.K. Guharay. *Predicting Raman Spectra Using Density Functional Theory*. Applied Spectroscopy 63 (7): 733-741 (2009)
- [35] W.E. Sinclair, D.W. Pratt. *Structure and vibrational dynamics of aniline and aniline-Ar from high resolution electronic spectroscopy in the gas phase*. The Journal of Chemical Physics 105 (18): 7942-7956 (1996)
- [36] X. Li, D.T. Moore, S.S. Iyengar. *Insights from first principles molecular dynamics studies toward infrared multiple-photon and single-photon action spectroscopy: Case study of the proton-bound dimethyl ether dimer*. The Journal of Chemical Physics 128 (18): 184308 (2008)
- [37] S.S. Iyengar. . Int. J. Quant. Chem. 109 3798 2009
- [38] X. Li, J. Oomens, J.R. Eyler, D.T. Moore, S.S. Iyengar. *Isotope dependent, temperature regulated, energy repartitioning in a low-barrier, short-strong hydrogen bonded cluster*. The Journal of Chemical Physics 132 (24): 244301 (2010)
- [39] P. Gilli, V. Bertolasi, V. Ferretti, G. Gilli. *Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding. 4. Covalent nature of the strong homonuclear hydrogen bond. Study of the O-H-O system by crystal structure correlation methods*. Journal of the American Chemical Society 116 (3): 909-915 (1994)



## CAPÍTULO 11

---

### Análisis estructural de complejos éteres–corona/ $\text{NH}_4^+$ de naturaleza quiral

---

El estudio de los requerimientos estructurales para el reconocimiento molecular de éteres–corona quirales constituye una tema de interés práctico y fundamental en la catálisis y ciencias analíticas. Consideramos aquí la variante del 18-crown-6 sustituido con cuatro grupos carboxílicos (que denotaremos  $18\text{c}6\text{H}_4$ ). La flexibilidad de esta molécula supone un desafío para su caracterización conformacional mediante técnicas experimentales y teóricas. En este estudio se ha utilizado nuevamente la espectroscopia vibracional infrarroja junto con cálculos mecanocuánticos para caracterizar la estructura del complejo aislado en fase gaseosa constituido por el  $18\text{c}6\text{H}_4$  (hospedador) y el  $\text{NH}_4^+$  (huésped). Los resultados muestran que la estructura más estable corresponde a una conformación de tipo “barril” sostenida por los puentes de hidrógeno que se generan entre los cuatro hidrógenos del amonio, dos grupos  $\text{C}=\text{O}$  de las cadenas laterales y cuatro oxígenos del anillo del éter, en una disposición bifurcada. Curiosamente, esta estructura es muy similar a la determinada mediante cristalografía de rayos X en estudios previos del  $18\text{c}6\text{H}_4$ . El experimento también proporciona evidencias de la contribución de un conformero de mayor energía de tipo “cuenco”, con características semejantes a las adoptadas en disolución acuosa por el  $18\text{c}6\text{H}_4$ , en complejos con aminas primarias. Esta conformación se caracteriza por la presencia de puentes de hidrógeno entre dos grupos carboxílicos de lados opuestos del anillo, y entre los cuatro enlaces  $\text{N}-\text{H}$  del amonio con el anillo del éter, y con uno de los grupos  $\text{C}=\text{O}$ . Los cálculos también predicen estructuras que en algunos casos implican incluso más puentes de hidrógeno intramoleculares en el sustrato  $18\text{c}6\text{H}_4$ , pero que tienen una mayor energía, y su contribución no se refleja en el espectro experimental.





## 11.1. Introducción

El reconocimiento molecular basado en los complejos formados por éteres-corona quirales constituye un campo de investigación activo, fuertemente estimulado por las aplicaciones tecnológicas en catálisis asimétrica [1,2] y en la separación analítica [3–9].

En la última década se han dedicado muchos esfuerzos al diseño y la síntesis de éteres-corona con diversos sustituyentes, con el objetivo de mejorar su selectividad quiral [10–14]. La mayoría de los estudios que se han realizado hasta la fecha se han centrado en la molécula quiral formada por la combinación del (18-Crown-6) con cuatro brazos carboxílicos en las posiciones 2,3,11 y 12 del anillo (ver la figura 11.1). Este sustrato, que denominaremos  $18\text{c6H}_4$ , se ha utilizado en numerosas ocasiones como hospedador selectivo para aminas protonadas, aminoácidos, aminoalcoholes y otros compuestos quirales de funcionalidad similar [4,5,9,15–20].

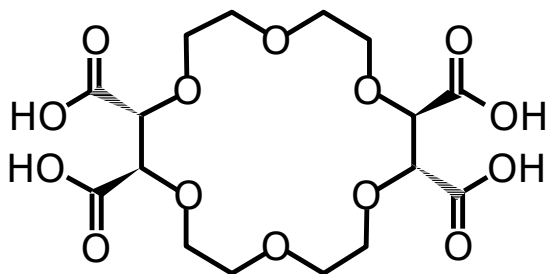


Figura 11.1: Representación esquemática de la estructura molecular de uno de los enantiómeros (+) del éter-corona de naturaleza quiral: (18-crown-6)-2,3,11,12-ácido tetracarboxílico (denotada como  $18\text{c6H}_4$  a lo largo del capítulo).

Tanto la cristalografía de rayos X [15, 16, 20], como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, [5, 16–18, 21, 22] son técnicas muy utilizadas en la investigación estructural de complejos diastereoméricos formados por éteres-corona. Dichos estudios han proporcionado evidencias de la relevancia de las estructuras tipo “barril” y “cuen-co” adoptadas por el  $18\text{c6H}_4$ . Dichas estructuras están sustentadas por puentes de hidrógeno intra-

moleculares entre los grupos carboxílicos, así como por interacciones intermoleculares del huésped catiónico con los oxígenos del éter y los de los grupos carboxilo. El enlace enantioselectivo está modulado además por la repulsión estérica entre las cadenas laterales del huésped (por ejemplo, una amina secundaria) y el sustrato.

En nuestro caso, para llevar a cabo esta investigación, y al igual que en el resto de estudios presentados en este bloque de la memoria, se ha empleado la espectrometría de masas de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (ESI-FT-ICR) para la producción y acumulación de los complejos  $18\text{c6H}_4\text{-NH}_4^+$  a temperatura ambiente. La caracterización de los modos vibracionales de los complejos se ha llevado a cabo mediante espectroscopía multifotónica de disociación en el infrarrojo medio (IRMPD). El experimento comprende la zona del infrarrojo medio situada entre los  $500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ , tomando como referencia las deformaciones asociadas a las bandas del C–C, C–O and C=O.

Más adelante, se realizará una descripción general del procedimiento experimental empleado y de los detalles técnicos pertinentes, así como de los métodos teóricos de simulación molecular utilizados de forma complementaria para la caracterización estructural de los complejos objeto de estudio.

### 11.1.1. Objetivos

El objetivo de esta investigación es el análisis conformacional del éter-corona de naturaleza quiral:  $18\text{c6H}_4$ , al formar complejos con el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Este sistema es interesante como modelo de coordinación multipodal, dando lugar a las mencionadas estructuras de tipo “barril” y “cuen-co”.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se pretende mostrar como ambos tipos de conformaciones pueden analizarse en complejos aislados en fase gaseosa mediante técnicas de espectroscopia láser y espectrometría de masas [?, 23, 24, 26, 27].

## 11.2. Metodología

### Análisis espectroscópicos.

Los complejos  $18c6H_4-NH_4^+$  se han producido mediante electronebulización a partir de disoluciones de concentración 1mM del éter-corona y amonio en una mezcla de agua/metanol con pequeñas cantidades de ácido acético. El análisis espectroscópico IRMPD de los complejos se ha realizado tal y como se describe en el capítulo ?? de esta memoria. Los principales fragmentos observados de la disociación del complejo  $18c6H_4-NH_4^+$  corresponden a la pérdida del amonio, dando lugar al  $18c6H_4$  protonado ( $m/z=441$ ) y a la ruptura de uno o dos brazos carboxílicos con la pérdida adicional de una molécula de agua ( $m/z= 395, 349$  y  $331$ ). Las bandas vibracionales asociadas al C–O y al C=O se analizaron repetidamente con potencias láser atenuadas para evitar la saturación de las mismas.

### Cálculos químico cuánticos.

La flexibilidad tanto del esqueleto molecular como de los brazos carboxílicos del  $18c6H_4$  hace necesaria una exploración muy cuidadosa del espacio conformacional de los complejos  $18c6H_4-NH_4^+$ . En primer lugar se ha llevado a cabo un “simulated annealing” para generar el conjunto de estructuras de partida. De entre ellas, se seleccionaron las 40 conformaciones de menor energía y se optimizaron mediante la teoría de la densidad funcional (DFT) aplicando un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d,p). Finalmente, los 15 conformeros más estables (en un intervalo de valores de energía libre de 40 kJ mol<sup>-1</sup>) se optimizaron nuevamente con bases de cálculo mayores del tipo 6-311++G(2d,2p). Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete Gaussian 09 [28].

Todos los valores de energía que se presentan a lo largo del capítulo corresponden a la energía libre de los conformeros calculadas como la suma de energías electrónicas y las correcciones térmicas y de vibración de punto-cero. No obstante, la consideración de energías electrónicas no corregidas da lugar a diferencias energéticas similares entre los conformeros relevantes en el presente estudio.

Los espectros de infrarrojo calculados teórica-

mente se han construido a partir de los modos de vibración de cada uno de los conformeros que resultan del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p) con un ensanchamiento de línea de 15 cm<sup>-1</sup> (anchura total a median altura). A las frecuencias vibracionales calculadas para todos los complejos se les ha incorporado un factor de escala de 0.975 para facilitar la comparación directa con el experimento. Este factor está en la línea de los propuestos en estudios previos para la redimensión de bandas empleando este nivel de teoría [29,30], aunque es ligeramente mayor al recomendado por el NIST [31]

## 11.3. Discusión de resultados

Los conformeros más estables resultantes del estudio computacional del complejo  $18c6H_4-NH_4^+$  pueden observarse en las figuras 11.2 y 11.3. El conformero de menor energía (1) muestra una estructura de tipo “barril” con simetría  $C_2$  que implica una coordinación tetrapodal del amonio con el éter-corona, en la que dos enlaces N–H del amonio interaccionan con dos oxígenos carboxílicos (C=O...HN distancia de 1.9 Å) y los otros dos enlaces N–H se coordinan de un modo parcialmente bifurcado con dos oxígenos del anillo (O...HN distancias de 2.1 y 2.4 Å). Esta configuración también está favorecida por un bajo grado de distorsión del anillo del éter, el cual mantiene una estructura prácticamente plana.

Este conformero (1) es muy parecido al resultante de medidas de cristalografía de rayos x publicado en un trabajo previo [20]. En la disposición cristalina los grupos carboxílicos no enlazados con el amonio, estaban puenteados por una molécula de agua, lo cual sugiere la fácil hidratación de este conformero. En fase gaseosa, los grupos carboxílicos no enlazados están relativamente libres para rotar dando lugar a estructuras estacionarias con pocos kJ mol<sup>-1</sup> de diferencia, como muestra el conformero 1b de la figura 11.2. Por otro lado, la rotación de uno de los grupos carboxilo enlazado mediante puente de hidrógeno en el conformero de menor energía, implica la sustitución del enlace C=O...HN por otro CHO...HN que conlleva un incremento considerable de la energía (*e.g.*, 16 kJ mol<sup>-1</sup> para el conformero 1c). Una rotación adicional del segundo grupo carboxilo enlazado en

el conformero de menor energía (no mostrado) da lugar a una estructura con un incremento de energía de similar magnitud.

El conformero 1d ilustra que la inversión del ángulo COH con respecto al conformero 1b es también un proceso altamente endotérmico, a pesar de que da lugar a una interacción favorable en principio de tipo puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo y uno de los oxígenos del anillo del éter-corona.

La figura 11.3 muestra los conformeros más estables con estructuras de tipo “cuenca” encontrados en nuestro estudio. Estos conformeros se sustentan por puentes de hidrógeno entre los brazos carboxílicos enfrentados ( $\text{C}=\text{O} \cdots \text{HO}$  distancia de unos 1.9 Å). Este tipo de configuración recuerda a la estructura típica postulada en estudios previos para los complejos del éter 18c6H<sub>4</sub> con aminas primarias protonadas [20].

En el conformero 2 ( $10 \text{ kJ mol}^{-1}$  mayor en energía que el conformero 1), el catión amonio permanece en la parte superior del éter adoptando una coordinación tripodal ( $\text{O} \cdots \text{HN}$  distancias de 1.9–2.0 Å) cualitativamente similar a la encontrada en el complejo del amonio con la molécula 18c6 nativa [32]. El resto de grupos NH coordinan con un grupo  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{C}=\text{O} \cdots \text{HN}$  distancia de 2.4 Å). Esta última coordinación se relaja significativamente si el grupo carboxilo se rota para exponer el extremo COH en lugar del  $\text{C}=\text{O}$  (conformero 2b) dando lugar a un incremento de la energía de *ca.*  $15 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

El conformero 3, también mostrado en la figura 11.3 es el siguiente en orden creciente de energía con respecto al conformero más estable (1). Combina características de los conformeros 1 y 2 para construir una red particularmente extensa de puentes de hidrógeno (hasta ocho enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares con distancias  $\text{O} \cdots \text{H}$  de 1.9–2.5 Å). Sin embargo, esto ocurre a costa de una deformación sustancial de la estructura del 18c6H<sub>4</sub> que implica una inversión desfavorable del ángulo COH. Como consecuencia, este conformero presenta una energía libre de  $27 \text{ kJ mol}^{-1}$  sobre la del conformero 1. Este hallazgo ilustra que la abundancia de puentes de hidrógeno intramoleculares, que permite la flexibilidad del anillo y de los cuatro brazos de la molécula 18c6H<sub>4</sub>, no fa-

Tabla 11.1: **Modos vibracionales asignados mediante cálculos B3LYP/6-311++G(2d,2p) a las principales bandas observadas en los espectros IRMPD del complejo 18c6H<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** El tipo de vibración dominante (en negrita) y los tipos de vibración secundarios significativos están indicados en cada caso. Las bandas se denotan con letras de la A a la J, en orden creciente de número de onda.

| Banda | Modo asignado  |
|-------|--|
| A     | <b>torsión OCOH</b> ; flexión COC  |
| B     | <b>flexión carboxílica OCO</b> ; torsión OCOH  |
| C     | <b>vibración paraguas CCOO</b> (brazos carboxílicos)   |
| D     | <b>estiramiento C-C</b> ; balanceo CH <sub>2</sub>   |
| E     | <b>estiramiento C-O-C</b> ; flexión COH, balanceo CH <sub>2</sub> , torsión de HCCH <sup>a</sup> |
| F     | <b>retorcimiento CH<sub>2</sub></b> ; flexión COH  |
| G     | <b>CH wagging<sup>a</sup></b> ; flexión COH  |
| H     | <b>CH<sub>2</sub> wagging</b> ; flexión COH  |
| I     | <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> wagging, CH<sub>2</sub> scissoring</b>                             |
| J     | <b>estiramiento C=O</b>  |
| *     | <b>estiramiento NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (combinación banda)</b> (tentativa ref. [33,34])      |

<sup>a</sup> en carbonos unidos a los brazos carboxílicos

vorece energéticamente el complejo 18c6H<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Más adelante se mostrará que los espectros experimentales IRMPD del complejo no son consistentes con los de este conformero teórico, lo que significa que su población es despreciable bajo las presentes condiciones de trabajo.

Además de los conformeros que acabamos de describir, del cálculo teórico B3LYP/6-311++G(2d,2p) ha resultado un amplio conjunto de conformeros de superior energía (del orden de  $28 \text{ kJ mol}^{-1}$  por encima que el conformero (1)), con estructuras de tipo “barril” y tipo “cuenca”, que no se muestran al no contribuir al espectro IRMPD del complejo 18c6H<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> investigado en este estudio.

El espectro experimental IRMPD del complejo 18c6H<sub>4</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se muestra en la figura 11.4 junto con los correspondientes espectros B3LYP de absorción infrarroja de los conformeros 1, 2, 1c, 1d y 3. Para facilitar la discusión, las diferentes bandas

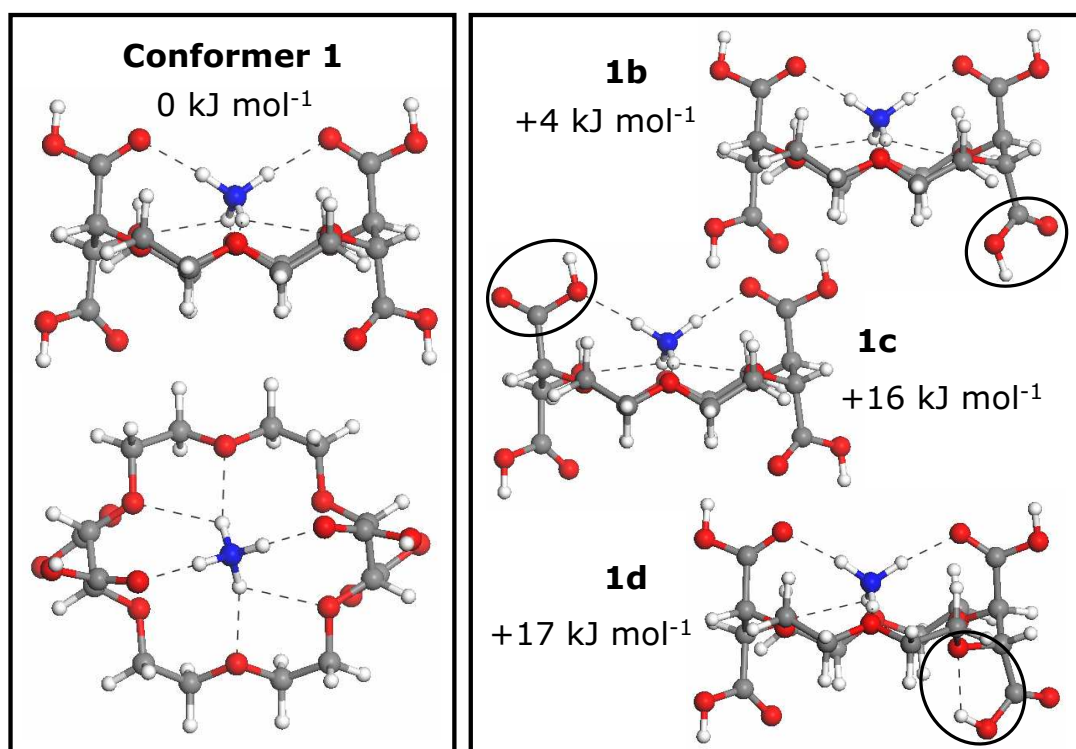


Figura 11.2: Representación del conformero más estable (1) del complejo en fase gaseosa  $18c6H_4-NH_4^+$  resultante del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p). Este conformero exhibe una estructura de tipo “barril” que responde a una simetría de tipo  $C_2$ . Se muestran algunas variantes energéticamente próximas (conformeros 1b, 1c y 1d). Los cambios más relevantes con respecto al conformero 1 y sus correspondientes valores de energía libre están indicados en cada caso. Es llamativo el hecho de que el conformero 1 es similar a la estructura postulada en experimentos cristalográficos previos [20]. La rotación de los grupos carboxilo no enlazados, que da lugar por ejemplo al conformero 1b, supone cambios energéticos relativamente pequeños. La rotación de uno de los grupos carboxilo enlazado al  $NH_4^+$  (conformero 1c) hace aumentar la energía del conformero en  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$ . La inversión del ángulo COH en el conformero 1b (conformero 1d) supone un incremento de energía similar.

vibracionales observadas en el espectro experimental se denotan con letras de la A a la J en orden creciente de número de onda. El tipo dominante de movimiento nuclear de los modos vibracionales asociados con cada una de las bandas se describe en la tabla 11.1. Las bandas A, B, C y J se asocian a modos vibracionales de los brazos carboxílicos, y son la torsión del enlace OH fuera del plano COOH (banda A), la flexión del ángulo del enlace OCO (banda B), una peculiar vibración tipo paraguas del grupo CCOO con el carbono del grupo carboxilo como centro vibracional (banda C) y los modos asociados a las tensiones de los grupos C=O enlazados y no enlazados (banda J). Las bandas D (tensión C-C), E (tensión C-O), F y H (modos de deformación del  $CH_2$ ) corresponden a movimientos vibracionales típicos del anillo

de éter-corona observados también en complejos de la éter-corona nativo 18-crown-6 [29, 32, 35]. La banda G (y parcialmente también la banda E) se asocian al “wagging” o la torsión de la secuencia HCCH enlazada al extremo de los brazos carboxílicos. Finalmente, la banda I está dominada por el “wagging” del  $NH_4^+$ , fuertemente acoplado con la vibración “scissoring” de los grupos  $CH_2$  del anillo del éter.

Una banda ancha, que no predice en su totalidad el cálculo B3LYP se aprecia en los espectros IRMPD alrededor de los  $1425 \text{ cm}^{-1}$  (banda denotada con un asterisco en la figura 11.4). Bandas experimentales similares en esta región del espectro se observaron para los complejos de  $NH_4^+$  con éteres de corona no sustituidos, 15c5 and 18c6 [32],

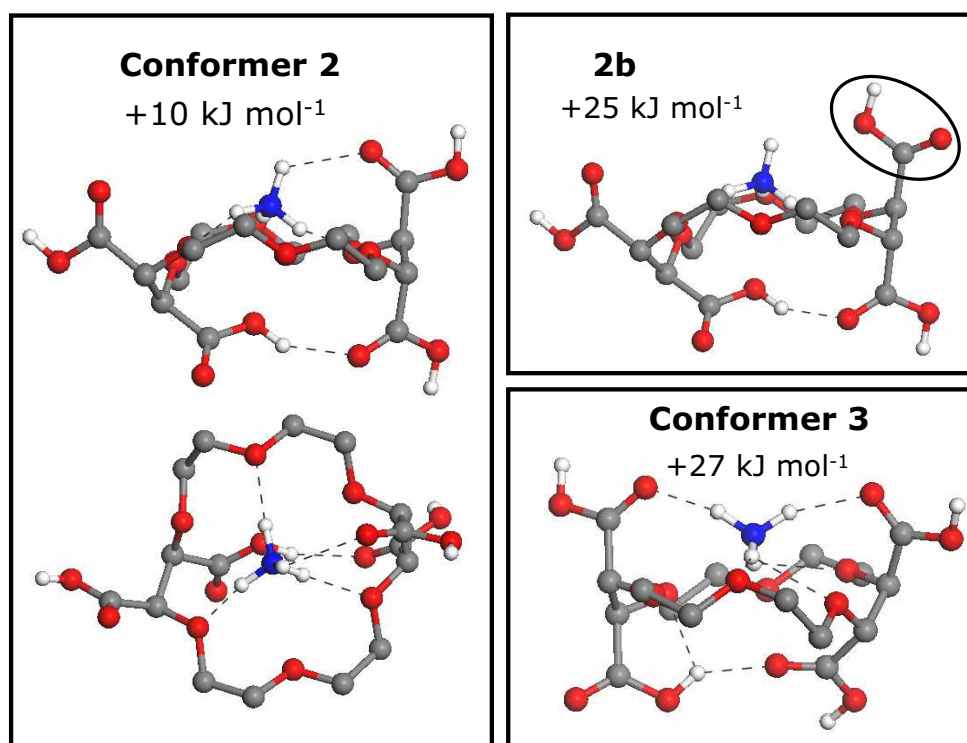


Figura 11.3: Representación de los conformeros de menor energía del complejo  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  con estructuras de tipo “cuenca”, resultado del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p). Los átomos de hidrógeno del anillo del éter no se muestran para mayor claridad. La energía libre de cada conformero (valor relativo a la energía del conformero más estable (1) (See Fig. ??) se indica en cada caso. La rotación del grupo carboxilo que da lugar al conformero 2b disminuye la coordinación con el catión amonio y resulta en un incremento significativo de energía. El conformero 3 combina características de los conformeros 1 y 2 y muestra un número de puentes de hidrógeno particularmente grande, aunque con el coste de la deformación sustancial del esqueleto del poliéter y un desfavorable ángulo de inversión.

y descritos en detalle en el capítulo anterior, así como en *clusters* de amonio protonado [33, 34]. En ninguno de esos casos las bandas aparecían en la predicción computacional. La asignación de la banda a vibraciones del amonio fue corroborada por medidas realizadas con la variante isotópica  $\text{ND}_4^+$  [32], como vimos en el capítulo 10. Para los *clusters* del amonio protonado, esta banda podría atribuirse, a partir de cálculos cuánticos, a una banda combinada asociada a estiramientos simétricos y antisimétricos. La realización de cálculos similares para los complejos  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  no es tarea sencilla y la exigencia de tal esfuerzo computacional queda fuera del ámbito de esta investigación, por lo que no podemos confirmar tal asignación en nuestro caso.

De acuerdo con los resultados de los cálculos

B3LYP/6-311++G(2d,2p) descritos anteriormente, el conformero 1 tipo “barril” y el conformero 2 tipo “cuenca” (y sus variantes energéticamente cercanas, resultado de la rotación de los grupos carboxilo) deberían dominar el espacio conformational del complejo  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  a temperatura ambiente. La figura 11.4 corrobora tal expectativa ya que puede observarse la excelente correlación que existe entre el espectro IRMPD y la contribución conjunta de los modos de vibración calculados para los conformeros 1 y 2.

El espectro teórico del conformero 1 reproduce con precisión los rasgos principales de las bandas vibracionales registradas experimentalmente, incluso para las bandas débiles en los intervalos  $550\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  (bandas A–D) y  $1200\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$  (bandas F–I). Por otro lado, los detalles finos de

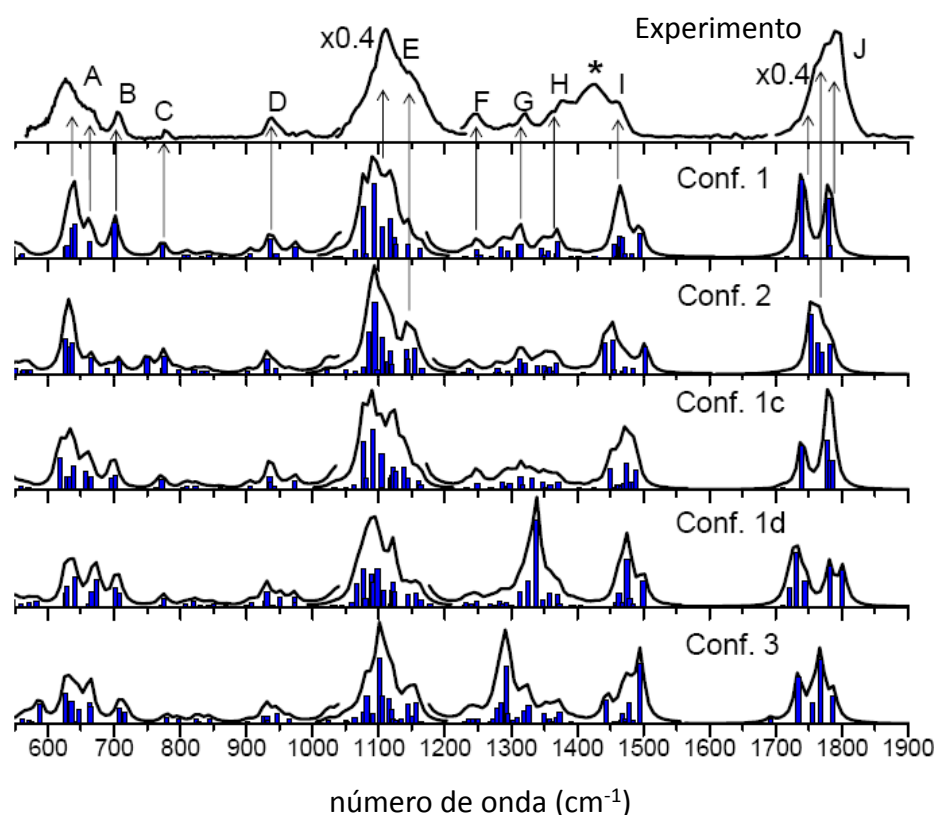


Figura 11.4: Espectro ESI-FT-ICR IRMPD del complejo en fase gaseosa  $(18c6H_4)-NH_4^+$  (panel superior). El correspondiente espectro armónico infrarrojo que predicen los cálculos B3LYP/6-311++G(2d,2p) para los conformeros relevantes de baja energía mostrados en las figuras ?? y ?? también se muestran para su comparación directa. Las intensidades de todos los espectros en la región de las bandas más intensas (C-O and C=O ( $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ , y  $1700-1900\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) se han redimensionado con un factor de 0.4 para una mejor visualización de las bandas más débiles. Las bandas vibracionales observadas experimentalmente se denotan con letras de la A a la J en orden creciente de número de onda, y los tipos dominantes de movimientos nucleares de los correspondientes modos vibracionales están descritos en la tabla ??

las envolventes de las bandas asociadas a los estiramientos C-O y C=O (bandas E y J, respectivamente) los reproduce el cálculo con una exactitud algo menor. El espectro B3LYP del conformero 1 parece subestimar la intensidad del “hombro” hacia el azul de la banda E a  $1150-1200\text{ cm}^{-1}$ . Además, el conformero 1 muestra una banda asociada a la tensión C=O de forma bimodal debido a dos diferenciados pares de grupos carboxilo enlazados y libres. En contraste, el espectro IRMPD muestra una banda ancha que abarca el intervalo  $1725-1850\text{ cm}^{-1}$ , que sugiere la contribución de componentes adicionales de la tensión C=O.

Puede apreciarse en la figura 11.4 que la incorporación del conformero 2 al análisis soluciona estas últimas discrepancias dando lugar a una casi perfecta concordancia entre el cálculo y el experimento. Por un lado, la banda E del conformero 2 muestra una envolvente estructurada que sirve para reproducir el “hombro” hacia el azul y también el relativamente afilado máximo de la banda experimental alrededor de  $1120\text{ cm}^{-1}$ . Además, la fusión de los componentes del estiramiento C=O en el conformero 2, junto con la banda bimodal del conformero 1, explica la banda ancha observada experimentalmente.

Las poblaciones relativas de los conformeros 1 y 2 en el experimento son difíciles de determinar a partir del espectro IRMPD. No obstante, se requeriría una contribución no inferior al 30 % del conformero 2 en la intensidad del IRMPD para reproducir las bandas E y J observadas en el espectro simulado. Tal valor sugiere que si asumimos condiciones de equilibrio termodinámico entre los conformeros 1 y 2, la diferencia de energía relativa de  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$  estimada para el conformero 2 puede estar significativamente sobreestimada por el cálculo B3LYP. De forma alternativa, las barreras de interconversión entre el conformero 2 y 1 podrían ser suficientemente altas como para inducir el atrapamiento cinético del conformero 2 de mayor energía bajo las presentes condiciones experimentales [20]. Esto resultaría en una distribución de no-equilibrio favoreciendo una población del conformero 2 más alta que la esperada a partir de los resultados del estudio energético.

Los conformeros 1c y 1d no parecen estar poblados en el experimento, ya que sus espectros IR B3LYP muestran diferencias apreciables con el espectro IRMPD, en concreto en el intervalo  $1200\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ . El conformero 1d muestra una banda intensa en  $1340 \text{ cm}^{-1}$  que no está presente en el espectro IRMPD, que se asocia directamente con la flexión del grupo COH que está unido mediante puente de hidrógeno con el anillo del éter (ver Fig. 11.2). En el caso del conformero 1c, las diferencias con las medidas IRMPD son más sutiles y están relacionadas principalmente con la ausencia de estructura en el espectro calculado a  $1200\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$  debido a las flexiones COH y a los modos de deformación del  $\text{CH}_2$ .

La figura 11.4 también sirve para corroborar que el conformero 3 no puede tener una población apreciable bajo nuestras condiciones experimentales, a pesar de su extensa red de puentes de hidrógeno. El espectro IR B3LYP del conformero 3 muestra dos bandas intensas alrededor de  $1290 \text{ cm}^{-1}$  y  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales no aparecen en el espectro IRMPD. De acuerdo con el cálculo B3LYP la banda  $1290 \text{ cm}^{-1}$  estaría relacionada con el “wagging” del CH y la flexión del grupo COH que participan en el puente de hidrógeno carboxilo-carboxilo (análogo a la banda G en el conformero 1), mientras que la banda situada en  $1500 \text{ cm}^{-1}$  de este conformero estaría dominada por un movimiento

de paraguas del huésped  $\text{NH}_4^+$ .

## 11.4. Conclusiones

En esta parte del proyecto de tesis hemos realizado un estudio conformacional del complejo  $18\text{c6H}_4\text{--NH}_4^+$ , formado por un éter-corona con cuatro brazos carboxílicos de naturaleza quiral con el catión amonio. Hemos aplicado para ello técnicas espectroscópicas y computacionales similares a las descritas en los capítulos precedentes.

La conformación más estable que predice el cálculo teórico para el complejo  $18\text{c6H}_4\text{--NH}_4^+$  aislado corresponde a una estructura del éter de tipo “barril” con simetría  $C_2$  con una disposición del anillo del éter prácticamente plana (conformero 1), que coincide esencialmente con la estructura determinada mediante métodos cristalográficos en estudios previos. Tal disposición implica una coordinación tetrapodal del catión  $\text{NH}_4^+$  con dos grupos C=O de los brazos carboxílicos enfrentados y con cuatro oxígenos del anillo del éter en una disposición parcialmente bifurcada.

En términos energéticos el siguiente conformero (2) obtenido del estudio teórico es el asociado a una estructura tipo “cuenca” caracterizada por la existencia de un puente de hidrógeno entre dos grupos carboxilo de lados opuestos del anillo. El catión  $\text{NH}_4^+$  también muestra una coordinación tetrapodal con el éter-corona, en este caso con tres oxígenos del anillo del poliéter y con uno del grupo C=O de uno de los brazos. Esta configuración es similar a las estructuras análogas tipo “cuenca” adoptadas por el  $18\text{c6H}_4$  cuando enlaza aminas secundarias.

La contribución conjunta de los espectros de infrarrojo resultantes del cálculo B3LYP/6-311++G(2d,2p) para los conformeros 1 y 2 muestra un excelente acuerdo con el espectro medido experimentalmente con la técnica IRMPD. Puede concluirse por tanto que este par de conformeros domina realmente el abanico conformacional del complejo  $18\text{c6H}_4\text{--NH}_4^+$  en fase gaseosa a temperatura ambiente. Se puede concluir que las estructuras tipo “barril” y tipo “cuenca” son óptimas para el enlace multipodal con aminas protonadas. De hecho,

es notable la similitud encontrada entre las características conformacionales del complejo  $18\text{c}6\text{H}_4\text{-NH}_4^+$  en fase gaseosa y las descritas en estudios previos de cristalografía de rayos x y de espectroscopia de resonancia magnética nuclear. El estudio

de las estructuras de tipo “barril” y “cuenco” en fase gaseosa ha servido para validar el método B3LYP/6-311++G(2d,2p), relativamente poco costoso, para la descripción de la arquitectura molecular del sistema.



---

## Bibliografia

---

- [1] Sh. Kobayashi, T. Hamada, S. Nagayama, K. Manabe. *Asymmetric Catalysis in Aqueous Media: Use of Metal-Chiral Crown Ethers as Efficient Chiral Lewis Acid Catalysts in Asymmetric Aldol Reactions*. Journal of the Brazilian Chemical Society 12: 627-633 (2001)
- [2] L. Yang, L.D. Tang, Y.M. Pan, H.S. Wang, G.F. Su, M. Liang. *Synthesis and catalytic activities of chiral azacrown ethers derived from rosin*. Chinese Journal of Organic Chemistry 28 (7): 1250-1253 (2008)
- [3] M. Lammerhofer. *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A 1217 (6): 814-856 (2010)
- [4] M.H. Hyun. *Preparation and application of HPLC chiral stationary phases based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid*. Journal of Separation Science 29 (6): 750-761 (2006)
- [5] Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura. *Nuclear magnetic resonance studies for the chiral recognition of the novel chiral stationary phase derived from 18-crown-6 tetracarboxylic acid*. Journal of Chromatography A 810 (1): 33-41 (1998)
- [6] Y. Kuwahara, H. Nagata, H. Nishi, Y. Tanaka, K. Kakehi. *Detection and separation of free amino acid enantiomers by capillary electrophoresis with a chiral crown ether and indirect photometric detection*. Chromatographia 62(9-10): 505-510 (2005)
- [7] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato. *Separation of enantiomers and isomers of amino compounds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography utilizing crown ethers*. Journal of Chromatography A 757 (1-2-3): 225-235 (1997)
- [8] R. Kuhn *Enantiomeric separation by capillary electrophoresis using a crown ether as chiral selector*. Electrophoresis 20 (13): 2605-2613 (1999)
- [9] T. Lee, W. Lee, M.H. Hyun, J.H. Park. *Enantioseparation of  $\alpha$ -amino acids on an 18-crown-6-tetracarboxylic acid-bonded silica by capillar electrochromatography*. Journal of Chromatography A 1217 (8): 1425-1428 (2010)
- [10] T.J. Wenzel, B.E. Freeman, D.C. Sek, J.J. Zopf, T. Nakamura, J. Yongzhu, K. Hirose, Y. Tobe. *Chiral recognition in NMR spectroscopy using crown ethers and their ytterbium(III) complexes..* Analytical and Bioanalytical Chemistry 378 (6): 1536-1547 (2004)
- [11] J.K. Kim, J.J. Seo, E.S. Yim, Y. Jin, S. Song, H. Suh. *Enantiomeric recognition in host-guest complexation using chiral bis-pyridino-18-crown-6 ethers, by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) enantiomer-labelled (EL) guest method*. Bulletin of the Korean Chemical Society 29 (5): 1069-1072 (2008)

- [12] Y. Turgut, T. Aral, H. Hosgoren. *Synthesis of novel  $C_2$ -symmetric chiral crown ethers and investigation of their enantiomeric recognition properties*. Tetrahedron: Asymmetry 20 (19): 2293-2298 (2009)
- [13] C.Y. Wang, D.H. Wang, T.H. Leng, Q.S. Yu. *Synthesis of a new enantiopure chiral aza crown ether and its application in enantiomeric separation*. Journal of Heterocyclic Chemistry 42 (6): 1043-1045 (2005)
- [14] M. Togrul, N. Deirel, F.B. Kaynak, S. Ozbey, H. Hosgoren. *Synthesis of Chiral Crown Ethers and Complexation with Chiral Protonated Amine Compounds: X-Ray Crystal and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Perchlorate Salt of Chiral Benzo-Monoaza-15-Crown-5 and Chiral Monoaza-15-Crown-5*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 50 (3-4): 165-171 (2004)
- [15] H. Nagata, H. Nishi, M. Kamigauchi, T. Ishida. *X-ray Structural Scaffold of 18-Crown-6 Tetracarboxylic Acid for Optical Resolution of Chiral Amino Acid: X-Ray Crystal Analyses of Complexes of D- and L-Isomers of Serine and Glutamic Acid* Chem. Pharmaceutical Bulletin 54: 452-457 (2006)
- [16] H. Nagata, Y. Machida, H. Nishi, M. Kamigauchi, K. Minoura, T. Ishida. *Structural Requirement for chiral recognition of amino acid by (18-crown-6)-tetracarboxylic acid: binding analysis in solution and solid states*. Bulletin of the Chemical Society of Japan 82: 219-229 (2009)
- [17] Y. Machida, M. Kagawa, H. Nishi. *Nuclear magnetic resonance studies for the chiral recognition of (+)-(R)-18-crown-6-tetracarboxylic acid to amino compounds*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30 (6): 1929-1942 (2003)
- [18] A.E. Lovely, T.J. Wenzel. *Chiral NMR discrimination of amines: Analysis of secondary, tertiary, and prochiral amines using (18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid*. Chirality 20 (3-4): 370-378 (2008)
- [19] P. Gerbaux, J. de Winter, D. Cornil, K. Ravicini, G. Pesesse, J. Cornil, R. Flammang. *Noncovalent interactions between ([18]crown-6)-tetracarboxylic acid and amino acids: electrospray-ionization mass spectrometry investigation of the chiral-recognition process*. Chemistry. A European Journal 14 (36): 11039-11049 (2008)
- [20] H. Nagata, H. Nishi, M. Kamigauchi, T. Ishida. *Guest-dependent conformation of 18-crown-6 tetracarboxylic acid: relation to chiral separation of racemic amino acids*. Chirality 20 (7): 820-827 (2008)
- [21] E. Bang, J.-W. Jung, W. Lee, D.W. Lee, W. Lee. *Recognition of (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector determined by NMR spectroscopy*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 (10): 1685-1692 (2001)
- [22] H. Duddeck, E. Díaz-Gómez. *Chiral Recognition of Ethers by NMR Spectroscopy*. Chirality 21 (1): 51-68 (2009)
- [23] J.-P. Schermann. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier B.V., Amsterdam 2008, ISBN: 978-0-444-52708-0
- [24] J.P. Simons. *Good vibrations: probing biomolecular structure and interactions through spectroscopy in the gas phase*. Molecular Physics 107 (23-24): 2435-2458 (2009)
- [25] M.S. de Vries, P. Hobza. *Gas Phase Spectroscopy of biomolecular building blocks*. Annual Review of Physical Chemistry 58 (1): 585-612 (2007)
- [26] N.C. Polfer, J. Oomens. *Vibrational spectroscopy of bare and solvated ionic complexes of biological relevance*. Mass Spectrometry Reviews 28 (3): 468-494 (2009)

- [27] T.R. Rizzo, J.A. Stearns, O.V. Boyarkin. *Spectroscopic studies of cold, gas-phase biomolecular ions*. International Reviews in Physical Chemistry 28 (3): 481–515 (2009)
- [28] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.1* Gaussian Inc.: Wallingford CT, 2009.
- [29] F. Gamez, P. Hurtado, B. Martínez-Haya, G. Berden, J. Oomens. *Vibrational study of isolated 18-crown-6 ether complexes with alkaline-earth metal cations*. International Journal of Mass Spectrometry 308 (2-3): 217-224
- [30] S.Z. Fairchild, C.F. Bradshaw, W. Su, S.K. Guharay. *Predicting Raman Spectra Using Density Functional Theory*. Applied Spectroscopy 63 (7): 733-741 (2009)
- [31] NIST Standard Reference Database 101; Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase: <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>.
- [32] P. Hurtado, F. Gámez, S. Hamad, B. Martínez-Haya, J.D. Steill, J. Oomens. *Crown Ether Complexes with  $H_3O^+$  and  $NH_4^+$ : Proton Localization and Proton Bridge Formation*. The Journal of Physical Chemistry A 115 (25): 7275-7282 (2011)
- [33] K.R. Asmis, Y. Yang, G. Santambrogio, M. Brümmer, L.R. McCunn, J.R. Roscioli, M.A. Johnson, O. Kühn, D.J. Goebbert. *Gas-Phase IR spectroscopy and multidimensional QM calculations of the protonated ammonia dimer*. Angewandte Chemie International Edition 46 (45): 8691-8694 (2007)
- [34] Y. Yang, O. Kühn, G. Santambrogio, D.J. Goebbert, K.R. Asmis. *Vibrational signatures of H-bonding in the protonated ammonia clusters  $NH_4+(NH_3)_{1-4}$* . The Journal of Chemical Physics 129 (22): 224302 (2008)
- [35] B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A.R. Hortal, S. Hamad, J. Steill and J. Oomens. *Emergence of Symmetry and Chirality in Crown Ether Complexes with Alkali Metal Cations*. The Journal of Physical Chemistry A 114 (26): 7048–7054 (2010)

